

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA STÉAROYL-COA DÉSATURASE1 (SCD1) UNE CIBLE THÉRAPEUTIQUE  
POTENTIELLE POUR LA STÉATOSE HÉPATIQUE

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR

MOHAMED AMINE LOUNIS

AOÛT 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»



**« L’art de la réussite consiste à savoir s’entourer des meilleurs. »**

**(John Fitzgerald Kennedy)**

**« Les grandes choses ne sont pas réalisées par la force, mais par la  
persévérance. »**

**(Samuel Johnson)**

**« Notre plus grande faiblesse réside dans l’abandon : La façon la plus sûre de  
réussir est d’essayer une autre fois. »**

**(Thomas A. Edison)**

**À TOUS CEUX QUI CROIENT EN MOI...**



## REMERCIEMENTS

La rédaction de cette thèse est le fruit d'un dur labeur et de sacrifices de plusieurs personnes qui n'ont jamais cessé de croire en moi et qui m'ont toujours soutenu dans les moments les plus difficiles. Je tiens tant à remercier comme il se doit les personnes ayant contribué de loin ou de près à l'élaboration de ce travail. Pour cela ces lignes furent sans aucun doute celles qui ont nécessité le plus d'efforts de ma part.

Mes remerciements les plus sincères et les plus profonds vont en premier lieu à Dr. Catherine Mounier, une directrice de thèse exemplaire qui a tout fait pour moi dès les premiers jours. Je n'oublierais jamais tout le soutien qu'elle a pu me procurer, ses mots d'encouragements, ses gestes nobles envers moi et envers ma petite famille, son implication et ses conseils. Catherine représente à mes yeux bien plus qu'une directrice de thèse.

MERCI CATHERINE VOUS ÊTES EXCEPTIONNELLE...

Mes remerciements s'adressent également à Dr. Karl-F. Bergeron qui m'a aidé durant les derniers mois de ma thèse. Ta disponibilité et tes conseils m'ont grandement servi lors de la réalisation de mes dernières expériences et de la rédaction des publications et de la présente thèse.

Je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail de doctorat sans le soutien de mes collègues de laboratoire. Au fil de ces années, Plusieurs d'entre eux sont devenus à présent des amis très proches. Je voudrais remercier spécialement, Quentin Escoula, Sabri Rial et Simon Lalonde pour leur aide et pour leurs contributions dans la réalisation de

certaines travaux. Je voudrais aussi remercier Frederik Desmarais, Giselle Fernandez, Fatma Bouazizi ainsi que tous les stagiaires qui ont eu la chance de faire partie du laboratoire. Votre générosité, bonne humeur et collaboration m'ont permis de progresser et de surpasser les moments les durs et décourageants.

Un grand merci s'adresse aux chercheurs et support technique qui ont collaboré avec nous durant nos différents projets, à savoir Dr. James M. Ntambi (Université de Wisconsin, USA) et Dr. David M. Mutch (Université de Guelph, Canada), sans oublier Victor Dumas (Université McGill, Canada) qui m'a permis d'acquérir de nouvelles expertises grâce à son aide et à son expérience technique.

Je souhaiterais par la même occasion remercier les responsables des laboratoires de Biomed spécialement les Dr. Julie Lafond, Dr. Éric Rassart, Dr. Benoit Barbeau, Dr. Laurent Poliquin et Dr. Nicolas Pilon pour m'avoir permis d'accéder à leurs équipements ainsi que pour leurs conseils précieux. J'aimerais remercier tous les étudiants du 3<sup>ème</sup> étage du département des sciences biologiques de l'UQAM.

Je ne remercierais jamais assez Daniel Lemieux qui m'a accompagné durant mes expériences d'enseignements de physiologie animale et humaine. J'ai toujours apprécié les bons moments passés ensemble et appris à tes côtés dans la bonne humeur. Gardes toujours ton sourire qui motive bien des gens.

Je remercie mes amis, précisément Mahdi et Asma et tous ceux que je connais, je n'oublierais jamais votre soutien et les merveilleux moments passés en votre présence.

Je n'aurais jamais atteint mon objectif sans l'apport constant des êtres les plus chers à mes yeux, les membres de ma famille.

Tout d'abord, je remercie infiniment mon cher père qui n'a pas cessé de croire en moi et qui est à mes yeux un exemple de persévérance, de patience et de volonté. Je voudrais remercier mes sœurs qui m'ont supporté dans les moments difficiles. Merci beaucoup je vous aime...

Mes beaux parents, mes beaux frères et sœurs, sachez que vous êtes ma deuxième famille et les personnes qui ont toujours trouvé les bons mots pour me motiver et me surpasser. Je vous remercie sincèrement.

Enfin, on dit « derrière chaque grand homme, se cache une femme », mais moi j'ai la chance d'avoir derrière moi trois femmes exemplaires.

Premièrement, ma chère mère, une femme de très grand cœur, une guerrière des temps modernes, celle qui a tout fait pour voir ses enfants réussir dans la vie. Maman tu es mon exemple, ces quelques mots ne pourrons pas exprimer tout ce que je peux dire pour te remercier, je pourrais écrire une thèse entière sur toi. J'espère que tu es fière de ton fils.

Deuxièmement, ma femme chérie, la femme de ma vie, celle qui m'a toujours regardé avec de grands yeux, celle qui a toujours trouvé les mots pour me faire remonter la pente quand je me sens abattu, celle qui me soutien et m'inspire. Je te remercie pour tout ce que tu m'offres à tous les jours, pour ta patience, ton soutien et ton amour.

Enfin, un grand merci à ma petite princesse, mon rayon de soleil, celle qui me fais oublier les échecs avec ses sourires et ses bisous. J'espère que tu réussiras dans ta vie et que tu seras fière de ton papa...



## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX .....	xv
LISTE DES FIGURES.....	xvii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	xxi
RÉSUMÉ .....	xxxi
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES .....	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Métabolisme des lipides.....	2
1.2.1 La lipogenèse <i>de novo</i> .....	2
1.2.2 La $\beta$ -oxydation.....	7
1.2.3 La captation des acides gras.....	11
1.3 La formation des gouttelettes lipidiques .....	12
1.4 Stress oxydatif, stress du réticulum endoplasmique.....	15
1.4.1 Stress oxydatif.....	15
1.4.2 Stress du RE .....	16
1.5 La Stéaryl-CoA Désaturase 1 (SCD1) .....	18
1.5.1 Structure, localisation et expression .....	18
1.5.2 Les différents isoformes .....	18
1.5.3 Régulation de l'expression et de l'activité de SCD1 .....	21
1.6 Rôles de SCD1 .....	22
1.6.1 Rôle dans la lipogenèse <i>de novo</i> .....	22
1.6.2 Rôle sur la $\beta$ -oxydation .....	24
1.6.3 Rôle sur l'inflammation.....	25
1.6.4 Autres rôles .....	27
1.7 La stéatose hépatique .....	29

1.7.1	La stéatose hépatique non alcoolique .....	30
1.7.2	La stéatose hépatique alcoolique .....	39
1.8	Progression de la stéatose hépatique .....	42
1.9	Modèles d'animaux pour la stéatose hépatique .....	43
1.9.1	Modèles animaux pour la NAFLD .....	43
1.9.2	Modèles d'animaux pour l'AFLD .....	50
1.10	Traitements de la stéatose hépatique .....	56
1.10.1	Traitements pour la NAFLD .....	56
1.10.2	Traitements pour l'AFLD .....	61
1.11	Problématiques et objectifs .....	63
CHAPITRE II		
OLEATE IS ESSENTIAL FOR SREBP-1C ACTIVATION AND MATURATION		
IN LIVER .....		
Avant-propos .....		68
2.1	Résumé .....	69
2.2	Abstract .....	70
2.3	Introduction .....	71
2.4	Materials and methods .....	74
2.4.1	Mice .....	74
2.4.2	Cell culture and treatments .....	74
2.4.3	Lipid droplet imaging .....	75
2.4.4	Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (QPCR) ...	75
2.4.5	Immunoblot analysis .....	75
2.4.6	Immunofluorescence .....	76
2.4.7	Lipid extraction and quantification using gas chromatography .....	77
2.4.8	Fatty acid uptake .....	77
2.4.9	<i>De novo</i> lipogenesis .....	78
2.4.10	Protein fatty acid modification assay .....	78
2.4.11	Statistical analysis .....	79
2.5	Results .....	79

2.5.1 SCD1 modulates number and size of lipid droplets .....	79
2.5.2 Fatty acid synthesis and uptake decreases in SCD1-deficient hepatocytes .....	80
2.5.3 Fatty acid $\beta$ -oxidation and PUFA content increase in SCD1-deficient hepatocytes .....	80
2.5.4 Oleate treatment rescues fatty acid content and SREBP-1c expression in SCD1-deficient cells.....	81
2.5.5 Oleate directly modulates SREBP-1c maturation.....	81
2.5.6 Oleate, but not palmitoleate, increases hepatic SREBP-1c maturation and <i>de novo</i> lipogenesis in mice .....	82
2.6 Discussion .....	83
2.7 Acknowledgments .....	89
2.8 Figures .....	90
CHAPITRE III	
HEPATIC BSCL2 (SEIPIN) DEFICIENCY DISRUPTS LIPID DROPLET HOMEOSTASIS AND INCREASES LIPID METABOLISM VIA SCD1 ACTIVITY.....	
Avant-propos .....	100
3.1 Résumé.....	101
3.2 Abstract .....	102
3.3 Introduction.....	103
3.4 Materials and Methods.....	106
3.4.1 Bsc12 knockout extracts.....	106
3.4.2 Cell culture and transfection .....	106
3.4.3 Lipid droplet imaging .....	107
3.4.4 Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) .....	108
3.4.5 Immunohistochemistry .....	108
3.4.6 Immunofluorescence .....	109
3.4.7 Immunoblot analysis.....	109
3.4.8 Lipid extraction and quantification using gas chromatography.....	110
3.4.9 Fatty acid uptake .....	110

3.4.10	<i>De novo</i> lipogenesis .....	111
3.4.11	Statistical analysis .....	111
3.5	Results .....	112
3.5.1	Seipin is expressed in hepatocytes.....	112
3.5.2	BSCL2 knockdown alters lipid droplet morphology and size .....	112
3.5.3	Alteration of lipid droplet homoeostasis following <i>BSCL2</i> knockdown is concomitant with changes in lipid metabolism .....	113
3.5.4	Seipin and SCD1 have opposing effect on LD formation and lipid synthesis .....	114
3.5.5	Seipin deficiency increases insulin sensitivity .....	115
3.5.6	Seipin deficiency increases the expression of ER stress markers .....	116
3.6	Discussion .....	117
3.6.1	ER-based regulation of lipid synthesis and storage within LDs.....	117
3.6.2	SCD1 activity and fatty acid metabolism.....	119
3.6.3	Lipogenesis and insulin resistance .....	120
3.7	Conclusion .....	121
3.8	Acknowledgments .....	121
3.9	Conflict of interest.....	122
3.10	Author contributions .....	122
3.11	Figures.....	123
3.12	Supplementary Figures .....	134
CHAPITRE IV		
SCD1 DEFICIENCY PROTECTS MICE AGAINST ETHANOL INDUCED LIVER INJURY .....		139
Avant-propos .....		140
4.1	Résumé.....	141
4.2	Abstract .....	142
4.3	Introduction.....	143
4.4	Materials and Methods.....	145
4.4.1	Mice .....	145
4.4.2	Chronic + binge protocol of alcoholic fatty liver disease induction .....	145



4.4.3 Plasma transaminase assays .....	146
4.4.4 Liver histology .....	146
4.4.5 Immunofluorescence .....	147
4.4.6 Triglyceride assay .....	147
4.4.7 HepG2 cell culture.....	147
4.4.8 Lipid droplet imaging .....	148
4.4.9 Real-time PCR analysis.....	148
4.4.10 Western blot analysis .....	149
4.4.11 Statistical Analysis.....	149
4.5 Results .....	150
4.5.1 Chronic + binge ethanol feeding leads to AFLD .....	150
4.5.2 SCD1 deficiency protects mice against AFLD .....	150
4.5.3 Effect of ethanol feeding on hepatic lipogenesis and $\beta$ -oxidation.....	151
4.5.4 SCD1 deficiency protects mice against ethanol-induced inflammation	152
4.5.5 SCD1 inhibition protects HepG2 cells against ethanol-induced injury	152
4.6 Discussion .....	153
4.7 Acknowledgments .....	156
4.8 Conflict of interest.....	157
4.9 Author contributions .....	157
4.10 Figures.....	158
CHAPITRE V	
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	169
5.1 Conclusion .....	169
5.2 Perspectives .....	171
5.2.1 Rôle de SCD1 dans la régulation du métabolisme lipidique .....	171
5.2.2 Rôle de la Seipine et de SCD1 dans le développement et la formation de la stéatose hépatique et des gouttelettes lipidiques chez les patients atteints de BSCL2 .....	180
5.2.3 Rôle de SCD1 et relation avec d'autres protéines du RE dans la formation des gouttelettes lipidiques .....	187
5.2.4 SCD1 : une cible thérapeutique pour la stéatose hépatique .....	189

APPENDICE A	
ROLE OF LIPOGENESIS AND LIPID DESATURASES IN NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE .....	195
A.1 Abstract .....	196
A.2 Résumé.....	197
A.3 Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Associated Pathologies ...	198
A.4 Characteristics of the Hepatic Lipid Droplets .....	202
A.5 Role of Lipogenesis in NAFLD .....	205
A.6 Role of Delta 5 ( $\Delta 5$ ) and Delta 6 ( $\Delta 6$ ) Desaturases in NAFLD .....	211
A.7 Role of the Stearoyl CoA Desaturase 1 in NAFLD .....	214
A.8 Conclusion .....	217
BIBLIOGRAPHIE .....	219

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Noms et classes des médicaments et profil de la stéatose associée.....	40
1.2 Modèles génétiques de NAFLD. ....	47
1.3 Différentes méthodes utilisées pour induire une AFLD. ....	51
1.4 Résumé des principaux modèles de souris génétiquement modifiés utilisés pour l'étude de l'AFLD. ....	52
1.5 Principales thérapies pharmacologiques utilisées dans la NAFLD.....	58
3.1 List of antibodies used for immunoblotting. ....	137
4.1 Primers sequences for mouse and human genes used in real-time PCR ....	166



## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 La lipogenèse de novo.....	3
1.2 Régulation transcriptionnelle de la lipogenèse de novo et de la glycolyse.....	5
1.3 La $\beta$ -oxydation.....	10
1.4 Structure de la gouttelette lipidique.....	13
1.5 Modèles de formation et expansion des GLs.....	14
1.6 Structure de SCD1.....	19
1.7 Diagramme du promoteur du gène SCD1.....	21
1.8 Modèle proposé du rôle de SCD1 dans le trafic des AGMI liés à la synthèse des TG et des esters de cholestérol (CE). ....	24
1.9 Développement de la stéatose hépatique non alcoolique chez les obséses....	32
1.10 Structure de la Seipine humaine et de son homologue chez la levure fld1p.....	36
1.11 Métabolisme de l'éthanol dans les hépatocytes.....	41
1.12 Représentation schématique de la progression de la stéatose hépatique.....	44
2.1 SCD1 knockdown and oleate treatment modulate the number and size of lipid droplets. ....	90
2.2 Inhibition of SCD1 expression decreases de novo lipogenesis in HepG2 cells.....	91
2.3 Inhibition of SCD1 expression decreases fatty acid uptake and increases $\beta$ -oxidation in HepG2 cells. ....	92
2.4 PUFA content of SCD1-deficient HepG2 cells.....	93
2.5 Oleate treatment of SCD1-deficient cells reverses a SREBP-1c expression and maturation defect. ....	94
2.6 Oleate association increases SREBP-1c nuclear localization and expression.....	95

2.7	Palmitoleate has no effect on SREBP-1c nuclear localization or expression. ....	96
2.8	Oleate production in the liver partially restores SREBP-1c maturation and lipogenesis in SCD1 knockout mice. ....	97
2.9	Hypothetical action mechanism of oleate in SREBP-1c activation. ....	98
3.1	Seipin expression in hepatocytes. ....	123
3.2	Seipin deficiency in hepatocytes affects LD formation, expansion and fusion. ....	125
3.3	Seipin deficiency increases fatty acid uptake in hepatocytes. ....	126
3.4	Seipin deficiency increases de novo lipogenesis in hepatocytes. ....	127
3.5	SCD1 knockdown reverses the phenotype observed in Seipin-deficient hepatocytes. ....	130
3.6	Seipin deficiency in hepatocytes promotes insulin sensitivity. ....	132
3.7	Seipin deficiency in hepatocytes increases the expression of ER stress markers. ....	133
3.8	Supplementary S1. Detection of Seipin by immunohistochemistry in various tissues. ....	134
3.9	Supplementary S2. BSCL2 deficiency in HepG2 cells affects lipid droplet formation. ....	135
3.10	Supplementary S3. SCD1 expression in HepG2 cells. ....	136
4.1	Chronic + binge ethanol feeding induces a severe form of liver injury in mice. ....	158
4.2	Effect of ethanol feeding on body weight and food intake in WT and SCD1 KO mice. ....	159
4.3	Liver histology after ethanol feeding of WT and SCD1 KO mice. ....	160
4.4	Effect of ethanol feeding on hepatic metabolic characteristics of WT and SCD1 KO mice. ....	161
4.5	Effect of ethanol feeding on expression of hepatic lipogenic and $\beta$ -oxidative genes. ....	162
4.6	Effect of ethanol feeding on expression of hepatic inflammation-related genes. ....	163
4.7	Effect of SCD1 inhibition on ethanol-treated HepG2 cells. ....	164
4.8	Schematic representation of the role of SCD1 in the development of alcoholic hepatic steatosis. ....	165

5.1	Marquage et identification de protéines cellulaires avec des acides gras $\omega$ -alkynylé bioorthologues. ....	175
5.2	Principe du BiFC. ....	188
A.1	Schematic representation of pathological conditions spectrum characterizing the NAFLD progression. ....	199
A.2	The lensing model of lipids droplets (LD) biogenesis. ....	204
A.3	De novo lipogenesis pathway. ....	206





## LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AA	Acide arachidonique (voir aussi C20:4n6)
ACADVL	Acadyl acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne très longue (Voir aussi VLCAD)
ACAT	Cholestérol Acyl-CoA Acyltransferase
ACC	Acétyl CoA Carboxylase
ACLY	ATP-Citrate Lyase
ACOX	Acyl-CoA Oxidase
ADG	Alkyl-2-3-diacylglycérol
ADH	Alcool déshydrogénase
AdipoR	Récepteur de l'adiponectine
ADN	Acide désoxyribonucléique (voir aussi DNA)
AFLD	Stéatose Hépatique alcoolique (voir aussi ALD)
AG	Acide gras
AGMI	Acide Gras Monoinsaturé (Voir aussi MUFA)
AGS	Acide Gras saturé (Voir aussi SFA)

AKO	Souris SCD1 déficientes spécifiquement dans le tissu adipeux
AKT	Protéine kinase B (voir aussi PKB)
AL	Acide linoléique (voir aussi C18:2n6)
ALA	Acide $\alpha$ -linoléique (voir aussi C18:3n3)
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
ALT	Alanine aminotransférase
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
AOX	Acyl-coenzyme A oxydase
AP-1	Activator Protein-1
ApoE	Apo lipoprotéine E
ARN	Acide ribonucléique (voir aussi RNA)
AST	Aspartate aminotransférase
ATF6	Activating transcription factor 6
BAL	Taux sanguin d'alcool
BSA	Albumine de sérum bovin
BSCL2	Lipodystrophie Congénitale de Berardinelli Seip-2
C/EBP	CAAT/enhance binding protein

CBR	Récepteur de la cannabinoïde
CBS	Cystathionine-b-synthase
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
CDIPT	CDP-diacylglycérol-inositol 3-phosphatidyltransférase
cDNA	ADN complémentaire
CE	Ester de cholestérol
CHOP	Protéine homologue de C/EBP (29 kDa)
ChREBP	Carbohydrate responsive element binding protein
CPM	Coup par minute
CPT-1	Carnitine palmitoyltransferase-1
CRP	C-Réactive Protéine
CTRL	Contrôle
CYP2E1	Cytochrome P450 2E1
DAG	Diacylglycérol
DGAT	Diacylglycerol Acyl-CoA Acyltransférase
DGLA	Acide dihomog- $\gamma$ -linoléique (voir aussi C20:3n6)
DHA	Acide docosahexaénoïque (voir aussi C22:6n3)
DNL	Lipogenèse <i>de novo</i>

DRO	Dérivés Réactifs D'oxygène (Voir aussi ROS)
dsRNA	Double-stranded RNA
EPA	Acide eicosapentaénoïque (voir aussi C20:5n3)
EtOH	Éthanol
FA-CoA	Fatty acyl-coenzyme A
FAD	Désaturases des acides gras
FAS	Acide gras synthase
FAT/CD36	Fatty Acid Translocase/CD36
FFA	Acide gras libres (Voir aussi AGL)
FOXO1	Forkhead box protein O1
FxR	Farnesoid X Receptor
G6PC	Glucose 6-phosphatase (Voir aussi G6P)
Gal	Galectine
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GCKR	Glucokinase (Voir aussi GCK)
GFP	Protéine fluorescente verte
GKO	Souris SCD1 déficientes

GL	Gouttelette Lipidique (voir aussi LD)
GLS3	Souris SCD1 déficientes produisant du palmitoléate spécifiquement dans le foie
GLS5	Souris SCD1 déficientes produisant de l'oléate spécifiquement dans le foie
GMPS	Guanosine mono phosphate synthétase
GPAT	Glycerol phosphate acyltransfèrease
Grp78	Glucose regulate protein 78
Gsta4-4	Glutathione S-transferase A4-4
GTT	Test de tolérance de glucose
H&E	Hématoxyline et Éosine
H2O	Eau
HCC	Carcinome Hépatocellulaire
HCV	Hépatite C Virale
HDAC1	Histone déacetylase1
HDL	Lipoprotéine à haute densité
HRP	Peroxydase de raifort (horseradish peroxidase)
HSL	Hormone Sensitive Lipase
IL	Interleukine

INF- $\gamma$	Intérferon gamma
IR	Résistance à l'insuline
IRE	Elément de réponse de l'insuline
IRE1 $\alpha$	Inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$
ITT	Test de tolérance à l'insuline
KO	Déficientes
LC/MS	Chromatographie en phase liquide/Spectrométrie de masse
LdC	Lieber deCarli
LDL	Lipoprotéine à faible densité
LepRE	Elément de réponse de la Leptine
LXR- $\alpha$	Liver X Receptor- $\alpha$
MAT	Méthionine adenosyl transférase
MBOAT	Membrane bound O-acyl transférase
MC4	Mélanocortine 4
MCD	Diète déficiente en méthionine et en choline
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MCV	Maladies cardiovasculaires
MT	Masson-trichrome

mTOR	Cible de la rapamycine chez les mammifères (mammalian target of rapamycin)
MTP	Mitochondrial trifunctional protein
N <sub>3</sub>	Azide
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAFLD	Stéatose Hépatique non alcoolique
NaOH	Sodium hydroxyde
NASH	Stéatohépatite non alcoolique
NCOR	Nuclear receptor co-repressor
NF-1/Y	Nuclear factor 1/Y
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
Nrf2	Facteur nucléaire érythroïdes 2
OA	Acide Oléique (voir aussi C18 :1)
OCT	Optimal Cutting Temperature compound
PA	Palmitate (voir aussi C16 :0)
PBS	Tampon phosphate salin
PC	Phosphatidylcholine
PECAM	Molécule d'adhésion plaquettaire et endothéliale

PERK	Protéine kinase RNA (PKR)-like kinase
PGC-1 $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor co-activator-1 $\alpha$
PL	Phospholipides
PMA	Palmitoléate (voir aussi C16 :1)
PNPLA	Patatin-like phospholipid domain-containing protein
Pol II	RNA polymerase II
PPAR $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$
PTEN	Hepatocyte-specific phosphatase and tensin homologue
PUFA	Acides gras polyinsaturé
PUFARE	Elément de réponse des acides gras polyinsaturés
QPCR	Réaction en chaîne de polymérase en temps réel ou quantitative
RE	Réticulum Endoplasmique (Voir aussi ER)
RXR	Retinoid X receptor
S1P	Sphingosine-1-phosphate
S2P	Sphingosine-2-phosphate
SCAP	SREBP cleavage activating protein
SCD1	Stéaroyl CoA désaturase1



SDS	Dodécylsulfate de sodium
SE	Ester de stérol
SMRT	Thyroid-hormone receptors
SRE	Sterol regulatory element
SREBP-1	Sterol Response Element Binding Protein-1
T3	Triiodothyronine
TCA	Acide Tricarboxylique
TG	Triglycérides (voir aussi TAG)
TK	Thymidine kinase
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale- $\alpha$
TR	Triiodothyronine receptor
UPR	Unfolded Protein Response
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité
WAT	Tissu adipeux blanc
WT	Wild Type ou Sauvages
YY	Ying yang
$\omega$ -3	Oméga-3
$\omega$ -6	Oméga-6



## RÉSUMÉ

L'accumulation d'acides gras dans le foie est appelée stéatose hépatique. Les deux principales formes sont la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) et la stéatose hépatique alcoolique (AFLD). Ces deux formes induisent des dommages au niveau des cellules hépatiques menant à une progression de la maladie et à des pathologies plus agressives et chroniques telles que la stéatohépatite, l'insuffisance hépatique, mais aussi la cirrhose irréversible et le carcinome hépatocellulaire (HCC). La NAFLD ainsi que l'AFLD sont réversibles à des stades précoces. Cependant, aucun traitement n'existe pour les formes plus agressives.

La stéaroyl-CoA désaturase1 (SCD1), est une enzyme clé dans la lipogenèse *de novo*. Elle joue un rôle central dans la biosynthèse des acides gras mono-insaturés à partir des acides gras saturés, en catalysant la désaturation en position  $\Delta 9$ . Ces acides gras insaturés sont les acides gras principalement utilisés pour la formation des triglycérides (TG). Des études précédentes ont montré que les souris SCD1 déficientes (SCD1 KO) sont résistantes à l'obésité et à l'installation d'une stéatose hépatique associée suggérant un rôle clé de SCD1 dans le stockage des lipides au niveau du foie.

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de caractériser les mécanismes moléculaires impliquant SCD1 dans le stockage hépatique des lipides et corolairement de montrer que la déficience hépatique en SCD1 induit une résistance à l'installation de la stéatose hépatique.

Dans la première étude, nous avons montré que l'inhibition de l'expression et de l'activité de SCD1 induit une diminution de l'expression et surtout de la maturation du facteur de transcription *Sterol Response Element Binding Protein-1* (SREBP-1). L'ajout d'acide oléique (OA), l'un des principaux produits de SCD1, restaure cette maturation. De plus, nous avons montré que l'OA serait essentiel pour la translocation de SREBP-1 dans le noyau de la cellule et donc pour l'activation transcriptionnelle des gènes lipogéniques.

Dans une deuxième étude, nous avons caractérisé le rôle hépatique de la Seipine, une protéine dont l'absence induit l'installation de la lipodystrophie congénitale de Berardinelli Seip (BSCL2) et une stéatose hépatique majeure associée à une forte activation de SCD1. Nos résultats montrent que la Seipine jouerait un rôle important

dans la stabilisation et la formation des gouttelettes lipidiques (GL) dans le foie. Aussi, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de SCD1 dans des hépatocytes déficientes en Seipine reverse le phénotype observé chez les malades BSCL2 menant à une diminution du nombre de GL et une restauration de l'homéostasie hépatique du métabolisme des lipides.

Dans la troisième étude, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de l'expression de SCD1 sur la progression et le développement de la stéatose hépatique alcoolique. Nous avons montré que des souris SCD1 déficientes sont résistantes à l'installation d'une stéatose hépatique alcoolique contrairement aux souris sauvages. Suite à une consommation d'éthanol (EtOH), les souris SCD1 déficientes présentaient une accumulation de gras hépatique pratiquement inexistante caractérisée par une lipogenèse *de novo* normale et une  $\beta$ -oxydation élevée contrairement à ce qui est observé chez les souris sauvages. De plus, les souris SCD1 déficientes ayant consommé de l'EtOH ne présentaient pas d'inflammation hépatique caractéristique de la stéatose alcoolique. Enfin, nous avons montré que l'utilisation en culture cellulaire d'un inhibiteur de SCD1 donne des résultats similaires à ceux obtenus chez les souris SCD1 déficientes suggérant que SCD1 pourrait être une cible pour le traitement de l'AFLD.

En conclusion, nos travaux montrent pour la première fois que la modulation de la lipogenèse serait dépendante du contenu hépatique en OA et que la modulation de l'expression de SCD1 constituerait une voie thérapeutique très prometteuse pour les personnes atteintes de formes variées de stéatose hépatique.

**Mots clés :** Foie, Stéatose hépatique, NAFLD, AFLD, acide oléique, SREBP-1, lipodystrophie, Seipine, Cible thérapeutique.

## CHAPITRE I

### ÉTAT DES CONNAISSANCES

#### 1.1 Introduction

Le maintien de l'homéostasie métabolique est une condition essentielle pour le maintien d'une vie saine. Il dépend principalement de l'équilibre entre les calories ingérées par l'alimentation et les calories dépensées pour les besoins des différentes cellules. Le débalancement de l'homéostasie est à l'origine de plusieurs troubles métaboliques induisant l'installation de plusieurs maladies telles que l'obésité, la stéatose hépatique, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires (Solinas, Boren et Dulloo, 2015).

Les acides gras (AG) intracellulaires proviennent principalement de l'alimentation mais ils peuvent aussi être synthétisés *de novo* à partir de l'Acétyl-CoA et du Malonyl-CoA produits par le catabolisme de différents substrats. Ces AG ingérés ou produits, sont principalement stockés dans le tissu adipeux et notamment dans les adipocytes sous forme de triglycérides (TG) (Solinas, Boren et Dulloo, 2015). Les TG sont des composés stables chimiquement et constituent une réserve importante d'énergie pour les cellules. Les adipocytes ont la capacité de stocker une grande quantité de TG dans une organelle intracellulaire appelée la gouttelette lipidique (GL).

Dans certaines conditions, les AG peuvent être stockés dans d'autres organes, induisant rapidement l'installation de nombreuses maladies métaboliques. Un des principaux organes capable de stocker une grande quantité de TG est le foie induisant

de ce fait le développement de la stéatose hépatique (Unger, 2003 ; Unger *et al.*, 2010). Chez l'humain, la lipogenèse *de novo* (DNL), contribue grandement à ce stockage ectopique dans le foie dans le cas d'un excès calorique (Ameer *et al.*, 2014 ; Jacome-Sosa et Parks, 2014). Une des enzymes clés de la DNL est SCD1. Cette enzyme joue un rôle clé dans la biosynthèse des AG mono-insaturés, en catalysant la désaturation en position  $\Delta 9$  des AG saturés. Ces AG insaturés sont ceux principalement utilisés dans la formation des TG (Ameer *et al.*, 2014). De plus, des études ont montré que les souris SCD1 déficientes sont résistantes au développement de la stéatose hépatique induite par une diète obésogène suggérant un rôle central de SCD1 dans le stockage hépatique des lipides (Miyazaki, Dobrzyn, Sampath, *et al.*, 2004 ; Miyazaki *et al.*, 2007).

Dans un premier temps, nous présenterons le métabolisme des lipides et la formation des GLs. En deuxième lieu, nous ferons une description détaillée du rôle de SCD1 dans le métabolisme des lipides principalement au niveau hépatique. Nous terminerons par une présentation des différentes formes de stéatose hépatique, des mécanismes moléculaires impliqués dans son installation et des différents modèles animaux utilisés pour son étude.

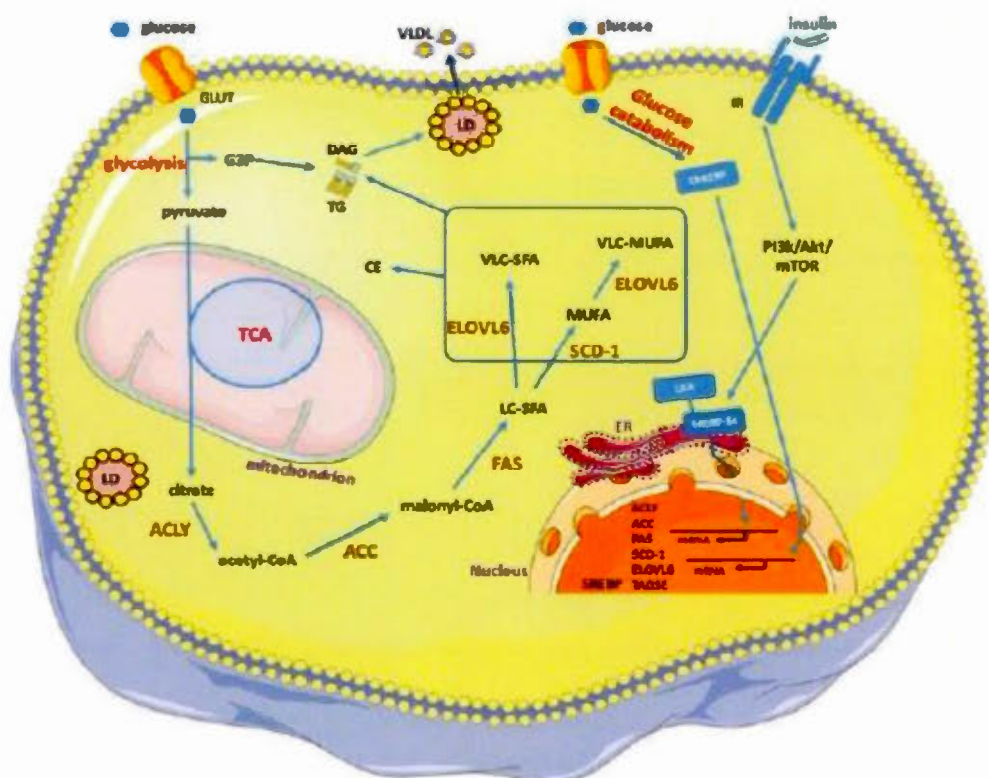
## 1.2 Métabolisme des lipides

### 1.2.1 La lipogenèse *de novo*

La lipogenèse se déroule essentiellement dans le foie, le tissu adipeux, l'intestin et la glande mammaire (Vernon, Barber et Travers, 1999) . Cependant, la synthèse des lipides qui se fait à partir de substrats tels que le glucose, les acides aminés ou d'autres acides gras est appelée la lipogenèse *de novo* (DNL). Cette voie se déroule



principalement dans le foie chez l'homme et le poulet (Lefevre *et al.*, 1999), et dans le foie et le tissu adipeux chez les rongeurs (Sampath et Ntambi, 2006). Après leur production, les AG libres néoformés sont estérifiés pour former les TG (transportés sous forme de VLDL) et les phospholipides (PL) (Schwarz *et al.*, 2003).



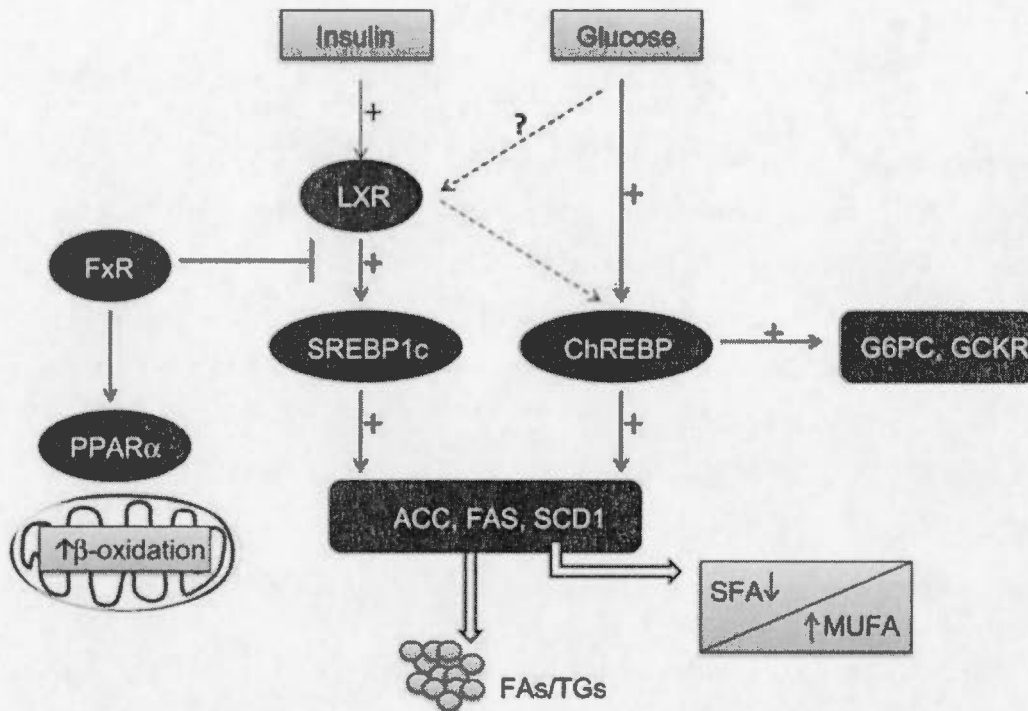
**Figure 1.1. La lipogenèse de novo.** Cette figure présente les mécanismes moléculaires de la lipogenèse *de novo*. Il a été montré que l'insuline et le glucose sont les deux principaux stimulateurs de la lipogenèse *de novo*. L'insuline active la voie PI3K/Akt/mTOR induisant le clivage et l'activation de SREBP-1c alors que le glucose sert de précurseur lipogénique et active les facteurs de transcription ChREBP et LXR (Lounis *et al.*, 2015).

Dans des conditions favorisant la synthèse des AG (en présence d'insuline et/ou de glucose), le glucose sanguin pénètre dans les hépatocytes via GLUT 2 et 4 (transporteur de glucose) pour former du pyruvate par la glycolyse. Le pyruvate ainsi formé est converti en acétyl-CoA par l'ATP-citrate lyase (ACLY) (Ameer *et al.*, 2014) puis converti en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA Carboxylase (ACC). Par la suite, la FAS permet la synthèse de palmitate (C16 :0) à partir de malonyl-CoA et d'acétyl-CoA (Strable et Ntambi, 2010). Le palmitate sera par la suite modifié par élongation, désaturation ou par estérification (**Figure.1.1**) (Lounis *et al.*, 2015).

L'élongation est effectuée par des élongases principalement par l'enzyme ELOVL6 (Strable et Ntambi, 2010). Les substrats d'ELOVL6 sont les AG saturés et mono-insaturés provenant de la lipogenèse *de novo* ou de la diète (Matsuzaka et Shimano, 2011 ; Moon *et al.*, 2014). Les AG saturés synthétisés par les élongases ou apportés par l'alimentation sont désaturés par l'enzyme SCD1 en position delta-9 pour former des AG mono-insaturés (Oléate : C18 :1 et palmitoléate C16 :1) qui sont préférentiellement utilisés pour la formation des phospholipides, des esters de cholestérol et des TG (Mauvoisin et Mounier, 2011 ; Strable et Ntambi, 2010).

La lipogenèse *de novo* est régulée principalement au niveau transcriptionnel. En effet, plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes lipogéniques comme LXR- $\alpha$ , sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c), ChREBP et farnesoid X receptor (Fxr) (Berlanga *et al.*, 2014) (**Figure.1.2**).





**Figure 1.2.** Régulation transcriptionnelle de la lipogenèse *de novo* et de la glycolyse.

Le glucose ainsi que la voie de signalisation de l'insuline régulent la conversion du glucose en AG par l'intermédiaire de la DNL en induisant l'expression des gènes glycolytiques et lipogéniques. L'insuline active l'expression du facteur de transcription SREBP-1c induisant l'expression des gènes lipogéniques (SCD1, FAS, ACC). ChREBP active quant à lui les gènes lipogéniques (ACC, SCD1, FAS) ainsi que les gènes glycolytiques (G6PC, GCKR). De plus, le ChREBP est aussi une cible directe des LXRs. Il modifie aussi le ratio AGMI/AGS en faveur des AGMI en stimulant l'activité de SCD1. Enfin, l'activation hépatique de FxR inhibe la synthèse des AG et des TG en inhibant l'activation de SREBP-1c et LXR  $\alpha$  et induisant l'expression de PPAR $\alpha$  activant ainsi la  $\beta$ -oxydation des AG (Berlanga *et al.*, 2014).

### 1.2.1.1 LXRs

Les LXRs sont une famille de facteurs de transcription nucléaires qui se lient à des récepteurs nucléaires comme les PPARs, le FxR et le RXR (Retinoid X receptor) (Baranowski, 2008). Il existe deux isoformes de LXRs nommés  $\alpha$  et  $\beta$ . LXR $\alpha$  est exprimé principalement dans les hépatocytes, les adipocytes et les cellules intestinales alors que l'isoforme  $\beta$  est ubiquitaire. La fonction majeure de LXR  $\alpha$  dans le foie est de stimuler la lipogenèse *de novo* via l'activation de SREBP-1c, FAS et SCD1 (Repa *et al.*, 2000 ; Schultz *et al.*, 2000).

### 1.2.1.2 SREBP-1c

Les SREBPs sont une famille de facteurs de transcription. Les SREBP sont des protéines membranaires (précurseur 125KD) du réticulum endoplasmique (RE). Afin d'être activés, ces facteurs de transcription sont clivés par des enzymes protéolytiques induisant l'accumulation de SREBP dans le noyau. Il existe différentes isoformes de SREBP, SREBP-1c et SREBP-2 qui sont exprimés dans le foie et l'isoforme SREBP-1a qui est exprimé à de très faibles quantités dans le foie, à la fois chez la souris, le rat et l'humain (Higashida *et al.*, 1991).

SREBP-1c qui est l'isoforme majoritaire du foie régule préférentiellement la transcription des gènes lipogéniques (FAS, ACC, SCD1 et SREBF lui-même) alors que SREBP-2 régule les gènes impliqués dans la synthèse et le métabolisme du cholestérol. SREBP-1a malgré son faible niveau d'expression au niveau hépatique active les gènes lipogéniques et du cholestérol (Shimomura *et al.*, 1997).

### 1.2.1.3 ChREBP

SREBP-1c est considéré comme un médiateur majeur de l'action de l'insuline sur les gènes lipogéniques. Cependant, l'activité de SREBP-1c seule n'est pas suffisante pour stimuler l'expression des gènes glycolytiques et lipogéniques (Denechaud *et al.*, 2008 ; Foufelle et Ferre, 2002). Des études ont montré que ChREBP joue aussi un rôle important dans l'induction de l'expression des gènes glycolytiques par le glucose et agit en synergie avec SREBP-1c pour stimuler les gènes lipogéniques (Dentin *et al.*, 2004 ; Ishii *et al.*, 2004 ; Ma, Tsatsos et Towle, 2005). De plus, il a été démontré que le ChREBP est une cible directe des LXR $\alpha$  qui sont des régulateurs de la voie de la lipogenèse *de novo* via l'activation de la transcription des gènes lipogéniques (ACC, FAS, SCD1) (Cha et Repa, 2007 ; Chen, G. *et al.*, 2004 ; Joseph *et al.*, 2002 ; Ulven *et al.*, 2005).

### 1.2.1.4 FxR

FxR est une famille de récepteurs nucléaires et de récepteurs de l'acide biliaire. L'activation de FxR module le métabolisme énergétique. En effet, son activation réduit le taux de TG en réduisant la synthèse des AG dans le foie via une inhibition de l'expression de SREBP-1c et LXR (Yang, Z. X., Shen et Sun, 2010), en augmentant l'expression de PPAR- $\alpha$  qui lui-même active le catabolisme des AG via la  $\beta$ -oxydation et en augmentant le relargage des TG (Berlanga *et al.*, 2014).

## 1.2.2 La $\beta$ -oxydation

La  $\beta$ -oxydation des acides gras se déroule dans la mitochondrie, le peroxysome et dans le RE. Elle facilite la dégradation des AG activés en acétyl-CoA. Les AG sont

activés par l'acyl-CoA synthétase en acyl-CoA dans le cytoplasme permettant ainsi aux AG de traverser les membranes et d'entrer dans les organelles. Les AG à courte et moyenne chaînes traversent les mitochondries sans activation via l'acyl-CoA synthétase. Par contre, les AG à longues chaînes traversent les mitochondries par l'intermédiaire de la CPT1. Le facteur de transcription PPAR- $\alpha$  et l'insuline sont les principaux régulateurs de la  $\beta$ -oxydation (**Figure.1.3**) (Berlanga *et al.*, 2014).

#### 1.2.2.1 PPAR- $\alpha$

PPAR- $\alpha$  est un régulateur et activateur central de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans les mitochondries et les peroxysomes (Kersten *et al.*, 1999). PPAR- $\alpha$  est fortement exprimé dans les hépatocytes surtout en état de jeûne. Cependant, un jeûne prolongé induit l'installation d'une stéatose hépatique, une hypoglycémie, une hypocétonémie et une hypothermie (Kersten *et al.*, 1999). PPAR- $\alpha$  est une famille de récepteurs nucléaires qui sont activés par certains acides gras à longue chaînes et de phosphatidylcholine (Chakravarthy *et al.*, 2009). Les produits de la FAS sont connus pour leur capacité à se lier directement à PPAR- $\alpha$  (Chakravarthy *et al.*, 2009 ; Chakravarthy *et al.*, 2005). En effet, le traitement de souris déficientes en FAS spécifiquement au niveau du foie et nourries avec une diète dépourvue d'acides gras et riche en carbohydrates, avec un agoniste de PPAR- $\alpha$  corrige la stéatose hépatique et l'hypoglycémie observées chez ces souris (Chakravarthy *et al.*, 2005).

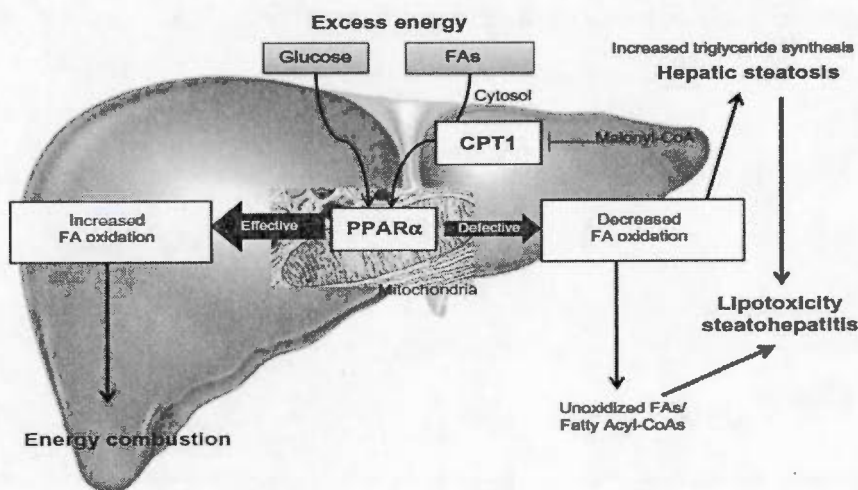
Plusieurs coactivateurs de PPAR- $\alpha$  ont été identifiés comme activateurs de la  $\beta$ -oxydation dans le foie. PGC-1 $\alpha$  est le principal coactivateur de PPAR- $\alpha$  activant la  $\beta$ -oxydation (Vega, Huss et Kelly, 2000). En état de jeûne, SIRT1 désacétyle PGC-1 $\alpha$  augmentant ainsi son activité (Rodgers *et al.*, 2005). De plus, SIRT1 interagit physiquement avec PPAR- $\alpha$  augmentant ainsi son activité transcriptionnelle dans le foie (Purushotham *et al.*, 2009). Enfin, la lipin1 dont l'expression est augmentée en

état de jeûne dans le foie a elle aussi la capacité de se lier à PPAR- $\alpha$  et PGC-1 $\alpha$  dans le noyau induisant l'activation de la  $\beta$ -oxydation (Finck *et al.*, 2006). À l'opposé, après un repas, l'insuline stimule la phosphorylation d'AKT et de mTORC1 induisant une stimulation de la phosphorylation de PGC-1 $\alpha$  induisant son incapacité à stimuler la  $\beta$ -oxydation (Li, X. *et al.*, 2007 ; Sengupta *et al.*, 2010).

### 1.2.2.2 CPT1

Mitochondrial carnitine palmitoyl transferase1 (CPT1), est une enzyme mitochondriale régulatrice qui transfère les AG du cytoplasme vers la mitochondrie où ils entrent dans la voie de la  $\beta$ -oxydation (Berlanga *et al.*, 2014). CPT1 est principalement inhibé par la malonyl-CoA, le produit de ACC, qui se lie à la partie cytosolique de CPT1. Chez les mammifères, il existe trois isoformes de CPT1 qui sont codées par trois gènes différents. L'isoforme CPT1 $\alpha$  est exprimé au niveau du foie, CPT1 $\beta$  au niveau des cellules musculaires et l'isoforme CPT1c est exprimé dans le cerveau et les testicules (Schreurs, Kuipers et van der Leij, 2010). L'insuline et l'hormone thyroïdienne régulent la sensibilité de CPT1 $\alpha$  dans le foie. Cependant, la CPT1 $\beta$  n'est pas affectée (Schreurs, Kuipers et van der Leij, 2010). Il a été montré que le taux de malonyl-CoA est inversement corrélé au taux de  $\beta$ -oxydation des acides gras (Lopaschuk *et al.*, 2010). En effet, des études sur des souris déficientes en ACC2 suggèrent l'existence de deux pools de malonyl-CoA produit par ACC1 (pour la DNL) et un pool cytosolique de malonyl-CoA produit par ACC2 impliqué dans la régulation de CPT1 et dans la  $\beta$ -oxydation (Schreurs, Kuipers et van der Leij, 2010)





**Figure 1.3. La  $\beta$ -oxydation.** Dans le foie, l'oxydation mitochondriale, peroxisomale et microsomale est régulé par PPAR- $\alpha$ . L'augmentation de l'expression de PPAR- $\alpha$  induit une diminution du stockage des AG (Berlanga *et al.*, 2014).

### 1.2.2.3 AMPK

L'AMP-activated protein kinase (AMPK) est un régulateur important de plusieurs voies de signalisation impliqué dans l'énergie systémique et cellulaire. En effet, l'AMPK joue un rôle de senseur énergétique dans la majorité des cellules et organes en inhibant les voies anaboliques et stimulant les voies cataboliques en réponse à une déficience en énergie (Viollet *et al.*, 2009). En effet, l'AMPK phosphoryle plusieurs protéines impliquées dans la lipogenèse *de novo* induisant ainsi leur désactivation menant à une diminution de la synthèse des acides gras. Le 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) et l'acetyl CoA carboxylase (ACC) sont les deux principales protéines impliquées dans la synthèse du cholestérol et des lipides et qui sont directement désactivées par l'AMPK (Corton, Gillespie et Hardie, 1994 ; Henin *et al.*, 1995). De plus, des études ont montré que l'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK réduit l'expression de SREBP-1c et

de ChREBP induisant une diminution de la lipogenèse *de novo* (Viollet *et al.*, 2009). À l’opposé, l’augmentation de l’activité de l’AMPK induit une désactivation de ACC induisant une diminution du taux cellulaire de malonyl-CoA. La diminution du taux de malonyl-CoA diminue l’activité de CPT1 induisant ainsi une diminution de la  $\beta$ -oxydation (Viollet *et al.*, 2009).

### 1.2.3 La captation des acides gras

Depuis des années, il existe une controverse concernant le mécanisme de la captation des acides gras à l’intérieur des cellules. En effet, certaines études penchent vers un transport facilité des acides gras alors que d’autres penchent vers un rôle important des transporteurs membranaires (Su et Abumrad, 2009). Cependant, les résultats des études appuient de plus en plus l’existence des deux méthodes de transports et pensent que le transport au moyen des transporteurs membranaires serait le moyen dominant pour la captation des acides gras à travers les cellules (Glatz, 2014). Une des sources principales des AG hépatiques est le recrutement des AGL à partir du flux sanguin. La captation des AG à travers le foie contribue à l’équilibre de la concentration des TG hépatiques. La captation des AG dépend de la concentration sanguine des AG, de la capacité des hépatocytes à les capter et aussi de l’activité et du niveau d’expression des protéines impliquées comme la FATP et la translocase des acides gras (CD36) (Berlanga *et al.*, 2014).

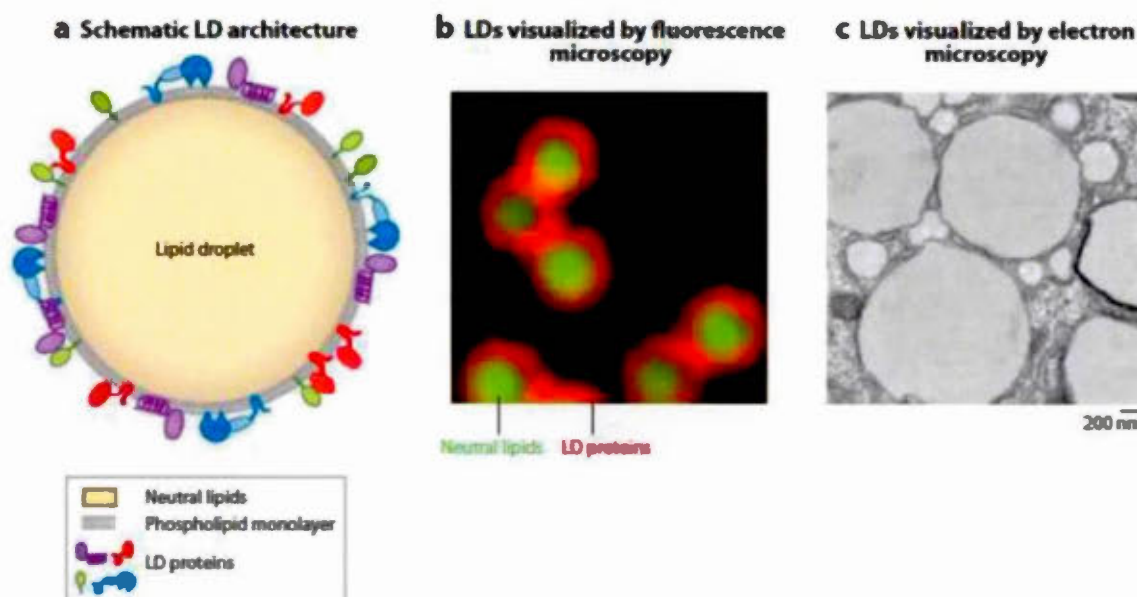
### 1.2.3.1 FAT/CD36

Les acides gras sont captés dans le foie passivement ou par l'intermédiaire d'une protéine de transport dont la plus importante est la translocase des AG (FAT/CD36). FAT/CD36 est exprimé dans plusieurs cellules telles que les macrophages, les adipocytes, les myocytes et les entérocytes (Berlanga *et al.*, 2014). Cette protéine transmembranaire joue un rôle important en facilitant la captation des acides gras et le transport intracellulaire des AG. L'insuline, la contraction musculaire ainsi que le facteur de transcription FOXO1 induisent la translocation de FAT/CD36 au niveau de la membrane plasmique augmentant ainsi la captation des AG (Berlanga *et al.*, 2014). CD36 est régulé transcriptionnellement par plusieurs facteurs de transcriptions comme pregnane X receptor (PXR), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- $\gamma$ ) and liver X receptor (LXR) (He *et al.*, 2011).

## 1.3 La formation des gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques (GL) sont des organelles cytoplasmiques dynamiques. Elles sont présentes de façon ubiquitaire dans les cellules. Elles sont formées d'un cœur lipidique contenant principalement des TG et des esters de stérols, et d'une monocouche phospholipidique contenant diverses protéines de surface (**Figure.1.4**) (Walther et Farese, 2012). Les GL ont été identifiées par microscopie électronique dès le XIX<sup>ème</sup> siècle. Elles ont été considérées durant des années comme étant un globule lipidique inerte avec peu de fonctions pertinentes. En 1991, Constantine Londos et ses collaborateurs, ont identifié une protéine, la perilipine, localisée spécifiquement sur la membrane des GL, ce qui a ouvert la voie à l'étude des mécanismes dynamiques de cet organelle (Blanchette-Mackie *et al.*, 1995).



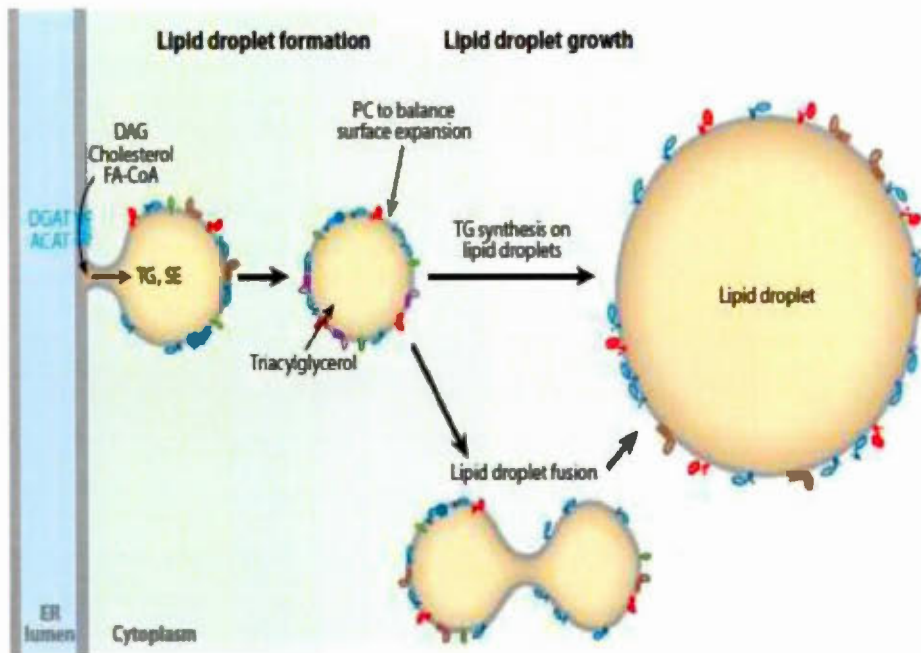


**Figure 1.4. Structure de la gouttelette lipidique.** a) Représentation schématique d'une gouttelette lipidique (GL). b) Visualisation des GL par microscopie à fluorescence. c) Visualisation des GLs par microscopie électronique (Walther et Farese, 2012).

Par la suite de nombreuses protéines faisant partie de la famille des perilipines ont été identifiées, incluant la perilipine 1, la perilipine 2 (ADRP, adipophiline), la perilipine 3 (TIP47, PP17), la perilipine4 (S3-12) et la perilipine5 (OXPAT/MLDP). Les perilipines 1 et 2 sont localisées exclusivement sur les GL alors que la 3 et la 5 sont recrutées du cytosol pour stabiliser les GL naissantes (Bickel, Tansey et Welte, 2009 ; Straub *et al.*, 2008). Des protéines membranaires de transport cellulaire ont aussi été localisées sur les GL telles que les protéines Rab spécialement Rab 18 , les cavéolines et les protéines COP (Walther et Farese, 2012).

Toutes les cellules ont des GL ou ont la capacité de les former (Walther et Farese, 2012). Par contre, on trouve un nombre élevé de GL dans les adipocytes et les

hépatocytes. La taille des GL diffère considérablement d'un type de cellule à un autre. La plupart des cellules ont des GL de petite taille (100nm-200nm de diamètre), par contre dans le tissu adipeux blanc le diamètre peut atteindre 100µm et couvrir la totalité du cytoplasme (Walther et Farese, 2012). Les GL sont juxtaposées au réticulum endoplasmique (RE), aux mitochondries et aux peroxysomes aussi bien dans les adipocytes que dans les autres types de cellules. Cette localisation expliquerait probablement le transport actif entre les GL et ces organelles (Walther et Farese, 2012).



**Figure 1.5. Modèles de formation et expansion des GLs.** Lors de leur formation, les GL sont soit attachées ou détachées du RE. Les enzymes impliquées dans la synthèse des AG neutres, ACAT ou DGAT catalysent la formation des lipides qui seront incorporés dans la GL. L'expansion des GL se fait soit par synthèse locale de TG dans la GL soit par fusion de GL (Walther et Farese, 2012) DAG : Diacylglycérol; TG : Triglycérides; PC : Phospholipides; FA-CoA; FA-CoA : Acyl-CoA; ER : Réticulum endoplasmique.

Dans les cellules des mammifères, les enzymes qui catalysent la dernière étape de la synthèse des TG et des esters de stérol sont localisées sur la membrane de RE à savoir la diacylglycerol acyl-CoA acyltransférase (DGAT) et la cholestérol acyl-CoA acyltransférase (ACAT) (Chang *et al.*, 2009 ; Smith *et al.*, 2000 ; Stone, Levin et Farese, 2006). Ces GL naissantes se formeraient et se développeraient en incorporant les esters de lipides synthétisés dans le RE mais cette association RE-GLs servirait aussi au flux de lipides dans le sens contraire c'est à dire des GL au RE (**Figure.1.5**) (Walther et Farese, 2012).

## **1.4 Stress oxydatif, stress du réticulum endoplasmique**

### **1.4.1 Stress oxydatif**

L'oxydation des acides gras dans les hépatocytes est la source majeure des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) comme l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde (Anstee et Goldin, 2006). Dans les conditions physiologiques normales, la  $\beta$ -oxydation mitochondriale est la voie principale pour le métabolisme des acides gras (Reddy et Hashimoto, 2001). En effet, dans les mitochondries, la chaîne de transport des électrons disperse la majorité des électrons libérés par la  $\beta$ -oxydation. Cependant certains électrons forment des anions superoxyde et d'autres ROS en faible quantité. Quand il y'a un excès d'acides gras dans les hépatocytes, la  $\beta$ -oxydation mitochondriale devient trop sollicitée ce qui nécessite l'utilisation d'autres voies alternatives pour l'oxydation des acides gras comme l'oxydation peroxisomale et endoplasmique (effectuée par les cytochromes P450-4A et P450-2E1). Dans des conditions pathologiques (stéatose hépatique), ces voies mineures induisent une augmentation des taux de ROS dans les hépatocytes. L'augmentation de la production cellulaire des ROS cause un stress oxydatif qui induit des dommages cellulaires sur l'ADN nucléaire et mitochondrial, la destruction de la couche phospholipidique de la membrane suite à la peroxydation des lipides et la libération

de cytokines pro-inflammatoires (Browning et Horton, 2004 ; Pessayre *et al.*, 2001). De plus, le stress oxydatif est amplifié à la suite de dommages mitochondriaux induits par la perte du cytochrome C menant à l'arrêt de la chaîne de transport d'électrons (McClain, Mokshagundam, *et al.*, 2004 ; Pessayre, Mansouri et Fromenty, 2002).

D'autre part, le stress oxydant est aussi due à une diminution de la production des substances détoxifiantes et des défenses antioxydantes (Scarpulla, 2011). En effet, une diminution de la production de glutathione réduit (GSH) indispensable pour la production de glutathione peroxydase (GPx) a été observé chez les patients atteints de stéatose hépatique. En effet, le GPx est responsable de la détoxification des cellules des ROS (Rolo, Teodoro et Palmeira, 2012). De plus, une diminution de la biogenèse des mitochondries est observée chez des patients atteints de stéatose. En effet, une diminution de l'activité de PGC-1 $\alpha$ , un régulateur de la biogenèse mitochondriale est observée. La diminution de PGC-1 $\alpha$  induit une diminution de la transcription des gènes impliqués dans la respiration mitochondriales en inhibant sa liaison aux éléments de réponse nuclear respiratory factor 1 et 2 (NRF-1 et NRF-2) ainsi qu'en inhibant les facteurs de transcriptions de l'ADN mitochondriale comme mtDNA transcription factor A (TFAM), mitochondrial transcription factor B1, and mitochondrial transcription factor B2. Enfin PGC-1 $\alpha$  régule aussi l'induction des défenses antioxydantes comme la superoxide dismutase, la catalase et la GPx (Rolo, Teodoro et Palmeira, 2012).

#### 1.4.2 Stress du RE

Le réticulum endoplasmique (RE) est un réseau de tubules fins qui possède différentes fonctions cellulaires importantes. En effet, le RE est l'organelle principale impliquée dans diverses voies sécrétoires (sécrétion de calcium, H<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, ...) dans toutes les cellules eucaryotes (Schroder et Kaufman, 2005). Il est aussi impliqué dans



le repliement, la biosynthèse, la translocation et les modifications post-traductionnelles des protéines (glycosylation, formation des ponts disulfure et repliement des protéines par les protéines chaperons) (Hampton, 2002 ; Zeeshan *et al.*, 2016). En effet, avant leur distribution à leurs organelles cibles, les protéines transmembranaires et sécrétoires entrent dans le RE pour le repliement. Les protéines qui ne se replient pas proprement sont dégradées dans le RE par le complexe Ubiquitine-proteasome (Zeeshan *et al.*, 2016). Les protéines chaperonnes et les enzymes travaillent ensemble afin d'éviter une grande charge de travail de dégradation du RE et l'aggrégation des protéines non repliées (Araki et Nagata, 2011). L'augmentation du taux de protéine avec un défaut de repliement induit leur aggrégation dans la lumière du RE provoque un stress du RE induisant une détérioration de l'homéostasie cellulaire (Scriven *et al.*, 2007). Pour restaurer l'homéostasie cellulaire après un stress du RE, une réponse adaptative appelée unfolded protein response (UPR) est initiée (Zeeshan *et al.*, 2016). Cependant, lorsque le stress du RE est prolongé et sévère, l'UPR peut devenir cytotoxique pour les cellules (apoptose). Il existe trois voies principales de l'UPR; la voie de l'inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ), la voie de la protéine kinase RNA (PKR)-like kinase (PERK), et la voie qui active le facteur de transcription 6 (activating transcription factor 6 (ATF6)). Ces voies détectent les conditions anormales dans la lumière du RE et transmettent des signaux au cytosol qui seront transmis par la suite aux noyaux par des facteurs de transcription (Walter et Ron, 2011).

Le stress du RE contribue à l'installation ou la progression de plusieurs maladies comme le diabète, l'athérosclérose, l'inflammation mais aussi les maladies du foie comme la stéatose hépatique (Zeeshan *et al.*, 2016). En effet, le stress du RE induit aussi une augmentation de la production des ROS ce qui contribue à l'aggravation de la stéatose hépatique en augmentant la production de cytokines pro-inflammatoires (Zeeshan *et al.*, 2016). Cependant, les données de la littérature ne prouvent pas si le

stress du RE est la cause de l'accumulation d'acides gras dans le foie ou s'il est à l'origine de la stéatose hépatique.

## **1.5 La Stéaryl-CoA Désaturase 1 (SCD1)**

### **1.5.1 Structure, localisation et expression**

SCD1 est une protéine membranaire du RE. Sa taille est de 37 kDa et présente une demi-vie de 3 à 4 heures (Paton et Ntambi, 2009). Elle est constituée de quatre domaines transmembranaires avec des terminaisons NH<sub>2</sub> et COOH terminales orientées vers le côté cytosolique de la membrane (**Figure.1.6**) (Paton et Ntambi, 2009).

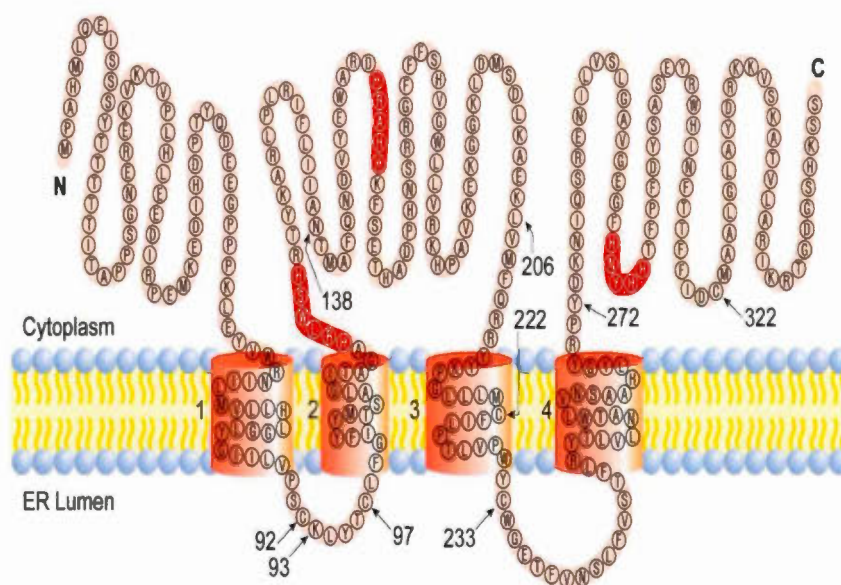
La protéine SCD1 est exprimée de façon ubiquitaire avec une forte expression observée dans l'hypothalamus, le tissu adipeux et le foie (Flowers et Ntambi, 2008 ; Sampath et Ntambi, 2011) . Elle catalyse l'insertion de la première double liaison-cis dans la position delta-9 des AG saturés (stéarate (C18 :0) (acide stéarique) et palmitate (C16 :0) (acide palmitoléique) les convertissant en AG mono insaturés (AGMIs) (respectivement en oléate (C18 :1) (acide oléique) et palmitoléate (acide palmitoléique) (C16 :1) (Paton et Ntambi, 2009).

### **1.5.2 Les différents isoformes**

SCD1 est exprimée dans la majorité des tissus mais son expression est prédominante dans les tissus lipogéniques comme le foie et les tissus adipeux chez la souris et l'humain. Son substrat préférentiel est le stéarate. Cependant, d'autres isoformes ayant la même fonction de désaturation que SCD1 existent. Chaque isoforme possède sa propre distribution tissulaire et sa spécificité de substrats suggérant un rôle métabolique

spécifique pour les différentes isoformes. Ils existent quatre isoformes de SCD1 chez la souris alors que chez l'humain il n'existe que deux isoformes (Paton et Ntambi, 2009).

Quatre isoformes ont été identifiées chez la souris (SCD1, SCD2, SCD3 et SCD4). Cependant, chez le rat seulement trois isoformes ont été identifiées. Chez la souris, les gènes de SCD sont localisés sur le chromosome 19 et codent pour un transcrit de 4,9kb (Paton et Ntambi, 2009).



**Figure 1.6. Structure de SCD1.** SCD1 est une protéine constituée de quatre domaines transmembranaires (1-4) et localisée principalement au niveau du RE. Les séquences indiquées en rouge représentent les domaines conservés essentiels pour l'activité catalytique de SCD1. Ces séquences contiennent des résidus HIS servant de ligand à l'atome de Fer et formant, une fois la protéine repliée, le site catalytique de l'enzyme. N et C représentent respectivement les domaines NH<sub>2</sub> et COOH terminaux (Paton et Ntambi, 2009).



Comme SCD1, l'enzyme SCD2 murine (mSCD2) est exprimée de façon ubiquitaire. Cependant, son expression est plus élevée dans le cerveau suggérant un rôle important dans le développement neuronal néonatal (Miyazaki *et al.*, 2005). De plus, une étude utilisant des souris SCD2 déficientes suggèrent que cette protéine jouerait un rôle important dans le développement hépatique en synthétisant les AGMI (Miyazaki *et al.*, 2005). Son expression est régulée positivement par une diète riche en glucose ou en AG saturés (Christianson *et al.*, 2008). Son substrat préférentiel est le palmitate.

L'isoforme mSCD3 est exprimé principalement dans les glandes sébacées de la peau (Zheng *et al.*, 2001), mais cette protéine se retrouve aussi dans certaines glandes exocrines comme la glande de Harder et la glande prépucciale (Miyazaki, Gomez et Ntambi, 2002). Son substrat préférentiel est le palmitate.

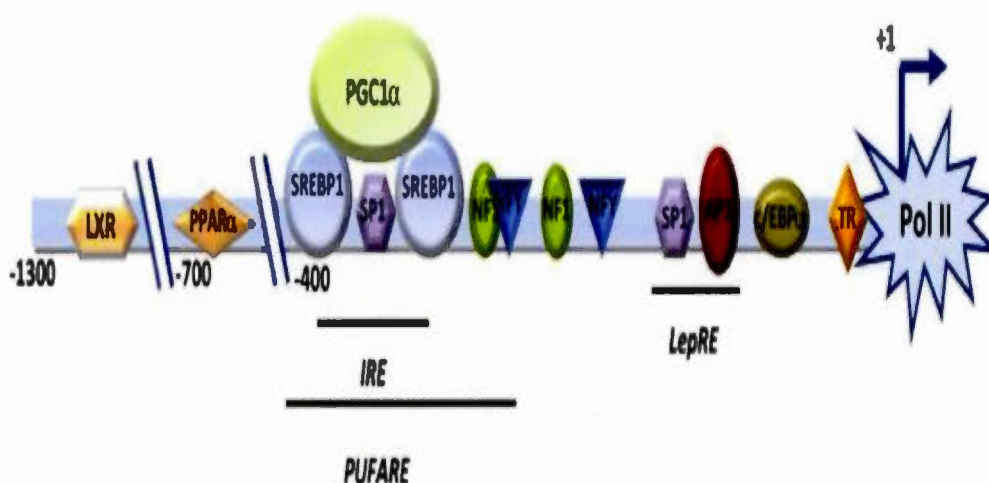
L'isoforme mSCD4 est exprimé exclusivement dans le cœur (Miyazaki *et al.*, 2003). La fonction exacte de cette protéine n'a pas encore été déterminée. Une étude a montré qu'une diète riche en glucose et dépourvu en AG induit une augmentation de l'expression de SCD4 (Miyazaki *et al.*, 2003). Aussi les souris déficientes en leptine (*ob/ob*) présentent une expression élevée de SCD4 dans le cœur suggérant un rôle potentiel de cette protéine dans le développement de la stéatose cardiaque observée chez ces souris (Miyazaki *et al.*, 2003). Son substrat préférentiel n'est pas encore déterminé.

L'isoforme mSCD5 est exprimé principalement dans le pancréas et le cerveau, mais une faible quantité de cette protéine a aussi été détectée dans les poumons, les reins, le cœur et le placenta (Wang, J. *et al.*, 2005). Son substrat préférentiel est le stéarate.



### 1.5.3 Régulation de l'expression et de l'activité de SCD1

L'expression de SCD1 est régulée positivement par une diète riche en carbohydrates ou en AG saturés ou mono-insaturés, par l'insuline et par les activateurs des peroxysomes proliférateurs (PPAR) ainsi que par le cholestérol (Flowers et Ntambi, 2008 ; Mauvoisin et Mounier, 2011 ; Paton et Ntambi, 2009). Par contre, la triiodothyronine (T3), l'estrogène, les acides gras polyinsaturés et la leptine sont quant à eux des inhibiteurs (Mauvoisin et Mounier, 2011). De plus, de nombreux facteurs de transcription semblent se lier à la région promotrice du gène SCD1 (SREBP-1c, LXR, PPAR- $\alpha$ , C/EBP- $\alpha$ , NF-Y, AP-1, Sp1, TR et PGC1- $\alpha$ ) suggérant une régulation importante de l'expression de SCD1 (**Figure.1.7**) (Mauvoisin et Mounier, 2011).



**Figure 1.7. Diagramme du promoteur du gène SCD1.** Le diagramme montre les différents facteurs de transcription et les régions impliquées dans la régulation de la transcription du gène SCD1. Cette figure résume les éléments caractérisés sur les promoteurs humain, de souris ou de poulet qui sont conservés entre ces espèces : LXR: Liver X Receptor, PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, SREBP: Sterol Regulatory Element Binding Protein, PGC-1 $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor co-activator-1 $\alpha$ , NF-1/Y: Nuclear factor 1/Y, AP-1: Activator Protein-1; C/EBP: CAAT/enhancer binding protein, TR: Triiodothyronine receptor, Pol II: RNA polymérase II; IRE Elément de réponse de l'insuline, PUFARE: Elément de réponse aux acides gras polyinsaturés ; LepRE: Elément de réponse à la Leptine (Mauvoisin et Mounier, 2011).

## 1.6 Rôles de SCD1

### 1.6.1 Rôle dans la lipogenèse *de novo*

Les souris SCD1 déficientes montrent une diminution des taux plasmatiques et tissulaires de palmitoléate (C16 :1) et d'oléate (C18 :1) et une augmentation des taux d'acide stéarique (C18 :0) et d'acide palmitique (C16 :0). Ces changements du contenu lipidique sont corrélés à une diminution de l'index de désaturation (18:1/18:0 or 16:1/16:0 ratio) dans le foie et le plasma (Paton et Ntambi, 2009).

Ces souris montrent aussi une diminution de la lipogenèse *de novo* dans le foie ainsi que dans les adipocytes. Cette diminution de la lipogenèse est sans doute le résultat d'une diminution de l'expression des gènes lipogéniques incluant FAS, ACC, SREBP-1c et ELOVL6 (Miyazaki, Kim et Ntambi, 2001 ; Ntambi *et al.*, 2002).

De plus, les souris SCD1 déficientes nourries avec une diète riche en fructose ne montrent pas d'augmentation de l'expression des gènes lipogéniques contrairement aux souris sauvages nourries avec une diète similaire (Miyazaki, Dobrzyn, Man, *et al.*, 2004). Cependant, l'ajout de 20% d'acide oléique à une diète riche en fructose induit une augmentation de l'expression de Srebp-1c chez les souris SCD1 déficientes mais n'atteignant pas le niveau d'expression observé chez les souris sauvages (Miyazaki, Dobrzyn, Man, *et al.*, 2004). Les auteurs suggèrent que l'oléate synthétisé de façon endogène (via SCD1) serait nécessaire pour induire une induction suffisante de SREBP-1c permettant l'activation de la lipogenèse (Miyazaki, Dobrzyn, Man, *et al.*, 2004).

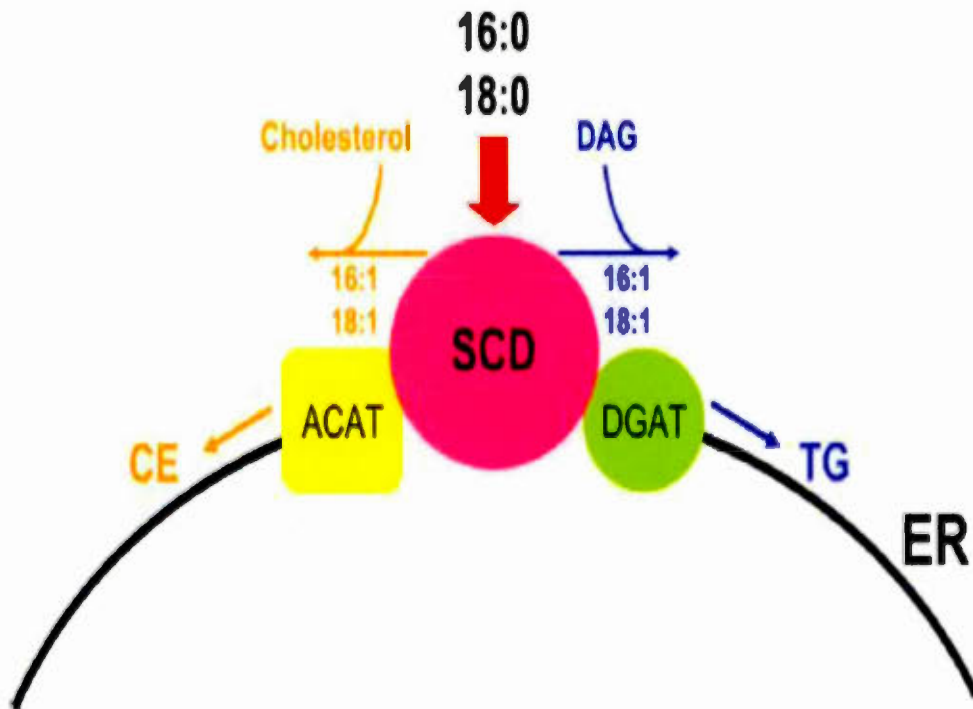
L'équipe de Ntambi a généré à partir des souris SCD1 déficientes, des souris capables de synthétiser soit de l'oléate soit du palmitoléate en insérant soit le gène SCD5 (synthétisant spécifiquement de l'oléate) ou SCD3 (synthétisant spécifiquement de palmitoléate) dans le foie (Burhans *et al.*, 2015). Les auteurs ont montré que seules

les souris synthétisant spécifiquement de l'oléate peuvent développer une stéatose hépatique et une augmentation du tissu adipeux contrairement aux souris SCD1 déficientes. Ces résultats suggèrent que l'oléate hépatique synthétisé par SCD1 est essentiel pour la régulation de l'homéostasie lipidique (Burhans *et al.*, 2015).

Cependant, des études supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation ainsi que dans le rôle de SCD1 et de ces produits dans la régulation du métabolisme lipidique. Les souris SCD1 déficientes présentent aussi un taux très faible de TG dans les VLDL et dans les lipoprotéines à faible densité (LDL) comparé aux souris sauvages (Chu *et al.*, 2006). De plus, l'augmentation de l'expression de SCD1 via la transfection des cellules ovarienne de Hamster Chinois induit une augmentation de l'estérification du cholestérol en esters de cholestérol (Miyazaki *et al.*, 2000). Ces observations suggèrent que les AGMI endogènes synthétisés par SCD1 servent à la synthèse des TG et aussi à celle des esters de cholestérol.

Il est intéressant de noter que la majorité des enzymes impliquées dans la lipogenèse *de novo* des TG et des esters de cholestérol incluant SCD, ACAT, DGAT et la glycérol phosphate acyltransferase (GPAT) sont localisées sur la membrane du RE (Paton et Ntambi, 2009). De plus, une étude a montré une colocalisation de SCD1 avec la DGAT2 dans le RE (Man *et al.*, 2006). Cette observation, ainsi que la proximité de localisation entre ces différentes protéines, permettrait ainsi aux AGMI synthétisés par SCD1 d'être transformés en TG et en esters de cholestérol grâce aux autres enzymes du RE (Paton et Ntambi, 2009) (**Figure.1.8**). Ces enzymes formeraient probablement un complexe permettant le trafic et le partitionnement des lipides dans différentes voies métaboliques. Des études complémentaires seraient nécessaires afin de comprendre le rôle exact de ces protéines et les mécanismes moléculaires impliqués.





**Figure 1.8. Modèle proposé du rôle de SCD1 dans le trafic des AGMI liés à la synthèse des TG et des esters de cholestérol (CE).** Il a été proposé par *Paton et al* que les AGMI endogènes synthétisés par SCD1 dans le RE, sont distribués vers l'enzyme DGAT pour la synthèse des TG et vers l'ACAT pour la synthèse des CE (Paton et Ntambi, 2009).

### 1.6.2 Rôle sur la $\beta$ -oxydation

Une augmentation de la  $\beta$ -oxydation des AG a été observée dans le foie et le tissu adipeux des souris SCD1 déficientes. En effet, une augmentation de l'expression de l'acyl-CoA oxidase (ACOX), de l'acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne très longue (ACADVL ou VLCAD), et de CPT1 (Ntambi *et al.*, 2002). Aussi, une augmentation de l'activité de l'AMP-activated protein kinase (AMPK) a été mesurée

chez ces souris comparativement aux souris sauvages (Man *et al.*, 2006). La phosphorylation de l'AMPK désactive l'ACC en la phosphorylant induisant ainsi une réduction des taux cellulaires de malonyl-CoA. La réduction du contenu cellulaire de malonyl-CoA, *via* l'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC, est associée à une augmentation de l'activation de CPT1 qui va induire une augmentation de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (Dobrzyn, P. *et al.*, 2004). En conclusion, la déficience en SCD1 induit une augmentation des AGS et conséquemment une réduction du contenu cellulaire en malonyl-CoA menant ainsi à une augmentation de la  $\beta$ -oxydation.

### 1.6.3 Rôle sur l'inflammation

Il existe certaines évidences de l'influence de SCD1 sur l'inflammation. Cependant, ces résultats sont contradictoires et les mécanismes moléculaires impliquant un rôle de SCD1 lié à l'inflammation restent à déterminer (Sampath et Ntambi, 2011). En effet, certaines études suggèrent que la déficience en SCD1 est associée à un effet anti-inflammatoire alors que d'autres études montrent un effet contraire.

Une étude supportant un effet pro-inflammatoire associé à la déficience de SCD1 a été publiée par MacDonald et ses collègues. Des souris dyslipidémiques déficientes pour le récepteur de la lipoprotéine à faible densité (LDLr) ont été croisées avec des souris SCD1 déficientes (SCD1<sup>-/-</sup> LDLr<sup>-/-</sup>). Ces souris présentent une augmentation de l'inflammation systémique associée à une augmentation des taux circulants des interleukines inflammatoires IL-6, IL-1 $\beta$  et IL-12p70 (MacDonald *et al.*, 2009).

L'inhibition de SCD1 chez des souris en utilisant des oligonucléotides anti-sens montre un effet anti-inflammatoire dans des macrophages isolés (Brown *et al.*, 2008). De plus, les souris où l'expression du gène SCD1 a spécifiquement été abolie dans le

tissu adipeux (AKO) montrent une augmentation de l'expression TNF- $\alpha$  dans le tissu adipeux associée à une réduction des taux plasmatiques d'adiponectine (Hyun *et al.*, 2010) tandis que les souris déficientes en SCD1 spécifiquement dans la peau présentent une augmentation de l'inflammation cutanée (Flowers *et al.*, 2011). En effet, l'adiponectine est sécrétée par les adipocytes et contribue à la réduction du contenu hépatique en TG et en glucose en favorisant l'augmentation de la sensibilité à l'insuline via l'activation de l'AMPK (Whitehead *et al.*, 2006).

De plus, le développement de conditions inflammatoires comme la colite ulcéreuse chez la souris est associée à une diminution de l'expression hépatique de SCD1 (Chen, C. *et al.*, 2008). En effet, une étude a montré que l'augmentation de l'activité de SCD1 contribue à l'augmentation des taux d'AGS plasmatique et macrophagique induisant une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (Brown *et al.*, 2008). Toutes ces études suggèrent donc que la diminution de l'activité de SCD1 aurait un effet pro-inflammatoire qui serait dû à une accumulation de AGS.

A l'opposé, des évidences supportent un effet anti-inflammatoire de la déficience en SCD1. En effet, des souris SCD1 déficientes nourries avec une diète riche en gras montrent une diminution de l'inflammation et de l'expression des gènes inflammatoires (MCP-1, TNF- $\alpha$ , CCR2) dans le tissu adipeux comparé aux souris sauvages nourries avec la même diète (Liu, X. *et al.*, 2010). Une autre étude montre une diminution de l'expression de TNF- $\alpha$  dans le tissu adipeux et un taux élevé d'adiponectine chez les souris SCD1 déficientes comparé aux souris sauvages (Hyun *et al.*, 2010). Enfin, dans le plasma humain le ratio de désaturation PMA/PA (Palmitoléate/Palmitate, estimation de l'activité de SCD1) dans la fraction des CE est associé à une augmentation du taux de protéine C-réactive (CRP), un marqueur de l'inflammation systémique (Petersson *et al.*, 2008 ; Petersson *et al.*, 2009). Ces observations opposées prouvent que l'impact de l'expression et de l'activité de SCD1

sur l'inflammation varie d'un tissu à un autre et en fonction du modèle où l'altération de l'expression de SCD1 a été effectuée.

#### 1.6.4 Autres rôles

En plus du rôle de SCD1 dans la lipogenèse *de novo*, la  $\beta$ -oxydation et l'inflammation, l'activité de SCD1 a la capacité d'altérer la fluidité membranaire cellulaire (Kim, Y. C. et Ntambi, 1999). En effet, SCD1 synthétise les AGMI qui sont les principaux constituants des phospholipides membranaires (Kim, Y. C. et Ntambi, 1999). L'altération de l'activité de SCD1 et du ratio de AGS / AGMI membranaire, agit non seulement sur la fluidité membranaire mais aussi sur les cascades de signalisation cellulaire influençant des paramètres physiologiques comme la sensibilité à l'insuline (Ariyama *et al.*, 2010 ; Dobrzyn, A. *et al.*, 2005 ; Miyazaki *et al.*, 2000) et la division cellulaire. Une étude a également montré que l'inhibition de SCD1 dans des adipocytes humains augmente le ratio de AGS / AGMI dans les phospholipides (PL) ce qui réduit ainsi la fluidité membranaire des cellules menant ainsi à une diminution de l'activation de la voie de signalisation à l'insuline (Collins *et al.*, 2010).

L'activité de SCD1 influence aussi la lubrification de la peau et des yeux (Miyazaki *et al.*, 2001 ; Zheng *et al.*, 1999). Les AGMI produits par l'activité de SCD1 sont des substrats essentiels pour la synthèse des esters de cire, des TG et des CE, qui sont des lipides lubrifiants secrétés par les glandes sébacées et les glandes de Meibomius (Synthèse de sébum et de meibum respectivement) de la peau et des paupières (Clarys et Barel, 1995 ; Miyazaki et Ntambi, 2003 ; Paton et Ntambi, 2009 ; Sullivan *et al.*, 2000). Les souris SCD1 déficientes présentent en effet un faible taux d'esters de cire, de TG et de CE dans les paupières et la peau comparativement aux souris sauvages



(Miyazaki, Man et Ntambi, 2001) ce qui se traduit chez ces souris par des yeux étroits et non lubrifiés et des maladies de la peau (Miyazaki, Man et Ntambi, 2001). De plus, l'incapacité des souris SCD1 déficientes à synthétiser de l'oléate endogène induit une élévation des taux de cholestérol libre menant à une mort cellulaire et une atrophie des glandes sébacées et des glandes de Meibomius (Miyazaki, Man et Ntambi, 2001 ; Miyazaki et Ntambi, 2003). Les yeux sont aussi lubrifiés par l'alkyl-2-3-diacylglycérol (ADG) qui est sécrété par la glande de Harder. L'ADG ainsi produit est composé d'eicosanoate (20 :1 n-9) qui résulte d'une elongation de l'oléate dérivée de SCD1 (Cohen, P. *et al.*, 2002 ; Miyazaki *et al.*, 2001). En effet le contenu en ADG des glandes de Harder dans les souris SCD1 déficientes est réduit comparé aux souris sauvages confirmant ainsi le rôle de SCD1 dans la lubrification des yeux (Miyazaki et Ntambi, 2003). Toutes ces évidences montrent clairement que SCD1 joue un rôle important dans la santé de la peau et des yeux.

Enfin, SCD1 joue aussi un rôle important dans la formation des lipoprotéines à très faible densité (VLDL) dans le foie. Les souris SCD1 déficientes montrent une réduction du taux hépatique de VLDL et de VLDL-TG (Miyazaki *et al.*, 2000), probablement due à l'incapacité des souris à produire des TG riches en AGMI qui sont les principaux composés incorporés dans les VLDL (Gibbons, 1990 ; Stefan *et al.*, 2008). Ceci réduit ainsi la capacité du foie à sécréter des taux élevés de TG et expliquerait aussi la résistance des souris SCD1 déficientes au développement d'une stéatose hépatique induite par une diète riche en gras (Ntambi *et al.*, 2002). Le taux plasmatique élevé de VLDL-TG est aussi associé à une augmentation des maladies cardiovasculaires (MCV). Une réduction de l'activité de SCD1 pourrait donc être bénéfique en réduisant la production et la sécrétion des VLDL-TG diminuant ainsi le développement des MCV (Miyazaki, Kim et Ntambi, 2001).



### 1.7 La stéatose hépatique

La stéatose hépatique, ou foie gras, est une accumulation de gras sous forme de TG dans les hépatocytes. Elle est la principale cause des dysfonctionnements hépatiques et des maladies hépatiques chroniques aussi bien dans les pays développés que ceux en voie de développement (Goceri *et al.*, 2016). La stéatose hépatique est une accumulation de TG induisant l'accumulation de GL microvésiculaires (microstéatose) ou macrovésiculaires (macrostéatose) dans au moins 5% des hépatocytes. La microstéatose est une accumulation de nombreuses et minuscules GL alors que la macrostéatose est caractérisé par la présence d'une seule et large GL (plus grande que le noyau) dans le cytoplasme des hépatocytes (McCormack *et al.*, 2011 ; Valls *et al.*, 2006). Généralement, la stéatose hépatique est évaluée histologiquement en utilisant la classification de Javor (Javor *et al.*, 2005) : grade 0 : < 5% des hépatocytes sont touchés, grade 1 : 5%-33% des hépatocytes sont touchés, grade 2 : > 33%-66% des hépatocytes sont touchés et le grade 3 : > 66% des hépatocytes sont touchés.

Au niveau cellulaire, la stéatose hépatique est le résultat d'un déséquilibre du métabolisme lipidique caractérisé par une augmentation de la lipogenèse *de novo* et de la captation des acides gras associée à une diminution de la  $\beta$ -oxydation (oxydation mitochondriale) et de l'exportation des TG sous forme de particules de lipoprotéine de très faible densité (VLDL) (Ress et Kaser, 2016). Les deux principaux types de stéatoses hépatiques sont la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) et la stéatose hépatique alcoolique (AFLD) (Ress et Kaser, 2016).

### 1.7.1 La stéatose hépatique non alcoolique

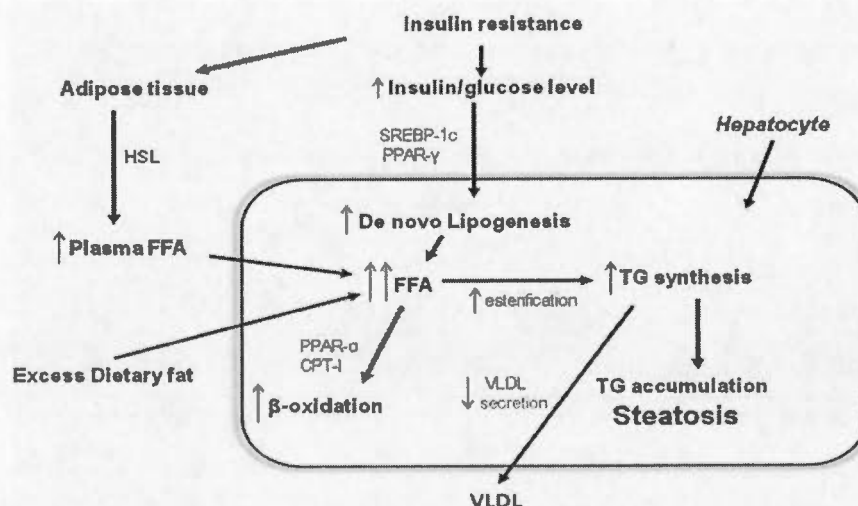
La NAFLD est une manifestation hépatique du syndrome métabolique. La NAFLD est diagnostiquée suite à la présence d'un excès d'accumulation de GL hépatiques en absence de toutes autres causes de maladie chronique du foie (Chalasani *et al.*, 2012). La NAFLD est souvent associée au développement du syndrome métabolique incluant la résistance à l'insuline, l'obésité viscérale, la dyslipidémie, le diabète de type 2 et l'hypertension (Krawczyk, Bonfrate et Portincasa, 2010 ; Lonardo *et al.*, 2011 ; Lonardo *et al.*, 2005). La physiopathologie de la NAFLD reste obscure. En effet, l'augmentation de la lipogenèse *de novo*, la diminution de l'oxydation mitochondriale des AG ainsi que l'inhibition de la sécrétion des TG contribuent au développement de la NAFLD (Ress et Kaser, 2016). L'augmentation de la lipogenèse *de novo* est essentiellement due à une augmentation de l'expression des facteurs de transcriptions SREBP-1c et Carbohydre responsive element binding protein (ChREBP) qui sont les régulateurs clés de la lipogenèse *de novo* (Carr et Ahima, 2016). Une augmentation de leur expression a été observée chez des patients souffrant de NAFLD ainsi que chez des modèles animaux de NAFLD (Benhamed *et al.*, 2012). De plus, une inhibition de l'expression de ces facteurs de transcription induit une amélioration de la NAFLD dans des modèles animaux (Dentin *et al.*, 2006 ; Yahagi *et al.*, 2002). La diminution de l'oxydation mitochondriale des AG est aussi retrouvée chez les patients atteints de NAFLD et résulterait d'effets direct et indirect sur la structure et la fonction des mitochondries (Caldwell *et al.*, 1999). De plus, la DNL et la  $\beta$ -oxydation sont en relation via SREBP-1c. En effet, en plus de son rôle de facteur de transcription sur les gènes classiques de la lipogenèse *de novo*, SREBP-1c active l'expression de l'enzyme acetyl-CoA carboxylase (ACC) augmentant ainsi la synthèse de malonyl-CoA. Le malonyl CoA inhibe la Carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) ce qui entraîne une diminution du transport des AG dans les mitochondries inhibant ainsi la  $\beta$ -oxydation (Ress et Kaser, 2016). La stéatose hépatique peut être

causée par divers facteurs et maladies, mais l'obésité et la lipodystrophie sont les principales causes fréquentes d'apparition de la stéatose hépatique non alcoolique.

#### 1.7.1.1 Chez les obèses

Le surpoids et l'obésité sont des problèmes majeurs de santé publique. En effet selon l'OMS à l'échelle mondiale, le nombre d'obèses a doublé entre 1980 et 2000 chez les adultes. En 2014, selon la même source, plus de 1,9 milliards d'adultes dans le monde sont en surpoids et plus de 600 millions sont obèses, ce qui représente 13% de la population mondiale (11% des hommes et 15% des femmes). L'obésité et le surpoids sont souvent associés à plusieurs maladies métaboliques tel que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, mais aussi la stéatose hépatique. En effet, la prévalence de la simple stéatose chez les individus obèses est de 30 à 37% (Woo Baidal et Lavine, 2016). Le risque de développer une NAFLD est de 16,5% chez les individus sains alors qu'il est de 75% chez les individus obèses (Bellentani *et al.*, 2000). La saturation des tissus adipeux (TA), qui est le lieu préférentielle de stockage des AG, induit une augmentation d'acides gras libres (AGL) circulants. Ces AGL vont ainsi être stockés de façon ectopique dans divers organes tels que le cœur, les muscles squelettiques ou bien le foie entraînant ainsi l'installation d'un syndrome métabolique (Gaggini *et al.*, 2013). De plus, chez les individus obèses atteints de NAFLD, des études ont montré une élévation du taux de la leptine qui serait corrélée avec la sévérité de la stéatose (Margetic *et al.*, 2002). En effet, la présence de la NAFLD et de l'hyper-leptinémie suggérerait le développement d'une résistance à la leptine, un autre facteur impliqué dans le développement du syndrome métabolique. Des résultats similaires ont été reportés chez des souris obèses nourries avec un régime riche en gras. Ces souris ont aussi développé une NAFLD associée à un taux élevé de leptine comme chez les humains (Li, Z., Soloski et Diehl, 2005).

En plus de l'obésité, certaines études suggèrent que la distribution du gras dans le corps aurait aussi un effet important sur le développement de la NAFLD. L'excès de dépôt adipeux, en particulier intra abdominal, serait la clé de la physiopathologie du NAFLD du fait de son association avec la résistance à l'insuline et du fait que ce dépôt abdominal serait la source d'AGL (Eguchi *et al.*, 2006). Une étude sur des individus ayant un poids normal montre une corrélation entre l'accumulation intra-abdominale de lipides et la résistance à l'insuline (Cnop *et al.*, 2002). En effet plusieurs études ont mené au modèle présenté plus bas pour le développement de la stéatose (**Figure.1.9**), démontrant un rôle clé de la résistance à l'insuline dans la physiopathologie de la NAFLD (Paschos et Paletas, 2009).



**Figure 1.9. Développement de la stéatose hépatique non alcoolique chez les obèses.** Dans le TA, la résistance à l'insuline diminue l'action inhibitrice de l'insuline sur l'hormone sensitive lipase (HSL). Ceci induit une forte lipolyse des TG et la libération des AGL. Ceci va induire une augmentation du taux circulant des AGL qui vont être captés par le foie. De plus, l'hyper insulinémie, une conséquence de la résistance à l'insuline, augmente la synthèse *de novo* des TG dans les hépatocytes. La synthèse des TG hépatiques est régulée par l'augmentation du contenu hépatique en AGL et est favorisée par la régulation positive des enzymes lipogéniques induite par l'insuline via le facteur de transcription peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ) et sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP-1) et une baisse de la sécrétion de VLDL (Paschos et Paletas, 2009).



### 1.7.1.2 Chez les lipodystrophiques

La lipodystrophie représente un large spectre de syndromes héréditaires ou acquis induisant une disparition quasi-totale du TA. La plus sévère d'entre elle est causée par la déficience de la protéine Seipine (Cartwright et Goodman, 2012). Le premier cas de syndrome lipodystrophique a été décrit en 1885, décrivant un patient avec une lipodystrophie partielle d'une étiologie inconnue et avec une atrophie progressive du TA dans la moitié supérieur de son corps. Les patients qui souffrent de lipodystrophie partielle ne souffrent pas de troubles métaboliques (Cartwright et Goodman, 2012). Par contre, dans les cas de perte extrême et généralisée de tissus adipeux, les conditions métaboliques chez ces patients deviennent beaucoup plus sévères. Les premières données de l'effet de la lipodystrophie générale ont été publiées par R.D. Lawrence en 1946 (Lawrence, 1946).

Ce syndrome est aussi appelé « diabète lipoatrophique » à cause des similitudes avec le diabète concernant les troubles métaboliques qui accompagnent la perte du TA. En effet, les patients atteints d'une lipodystrophie générale ou partielle sévère souffrent d'une hypertriglycémie secondaire à la perte de capacité de stockage du TA par les cellules adipocytaires. Cette hyperlipidémie peut induire une pancréatite récurrente et est souvent associée au stockage ectopique de lipides et à l'insulino-résistance (Cartwright et Goodman, 2012). L'accumulation des lipides dans les tissus non adipeux, tels que le muscle squelettique et le foie, donne aux patients une apparence maigre avec une hypertrophie musculaire, des veines saillantes et une organomégalie avec une saillie ombilicale. Cette organomégalie est souvent associée au développement d'une hernie ombilicale, d'une stéatohépatite, se transformant en cirrhose.

Les patients atteints de lipodystrophie générale affichent un faible taux de lipoprotéine à haute densité (HDL), un faible taux d'hormones adipocytaires (leptine et adiponectine) ainsi qu'une augmentation de la température corporelle, de la

transpiration et un appétit vorace due au faible taux de leptine circulant. En 1954 et 1959, W. Berardinelli et Martin Seip, ont rapporté et caractérisé les premiers cas héréditaires du syndrome de lipodystrophie congénitale, appelé par la suite lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip (BSCL) (Berardinelli, W., 1954 ; Lawrence, 1946 ; Seip, 1959).

Le diagnostic des BSCL est souvent posé dès la naissance ou au cours des deux premières années de la vie, grâce notamment à la maigreur des enfants et l'apparence de leurs muscles. Ces patients souffrent dès leurs plus jeune âge de plusieurs symptômes tel que une résistance à l'insuline, ainsi qu'une NAFLD sévère (Cartwright et Goodman, 2012).

### 1.7.1.3 La Seipine

La majorité des lipodystrophies congénitales sont dues à des mutations du gène BSCL qui code pour une protéine appelée Seipine (Magre *et al.*, 2001). Les mutations induisent la formation d'une protéine tronquée non fonctionnelle (Magre *et al.*, 2001).

#### a) Structure, localisation et expression de la seipine

La Seipine est une protéine membranaire du RE qui se concentre au niveau des jonctions avec les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques. Le gène de la Seipine a été identifié pour la première fois chez les mammifères et la drosophile (Cartwright et Goodman, 2012 ; Magre *et al.*, 2001) puis chez les champignons et les plantes (Fei, Du et Yang, 2011). Ces orthologues montrent une région centrale de 230 acides aminés dont la structure secondaire est conservée et qui est formée de deux domaines transmembranaires (TMDs) et d'une boucle cytosolique (**Figure.1.10**) (Cartwright et Goodman, 2012). Il existe trois isoformes de la Seipine (Magre *et al.*, 2001) qui sont

exprimés de façon ubiquitaire dans tous les tissus. Cependant les isoformes 1 et 3 sont majoritairement exprimés au niveau du cerveau (Magre *et al.*, 2001).

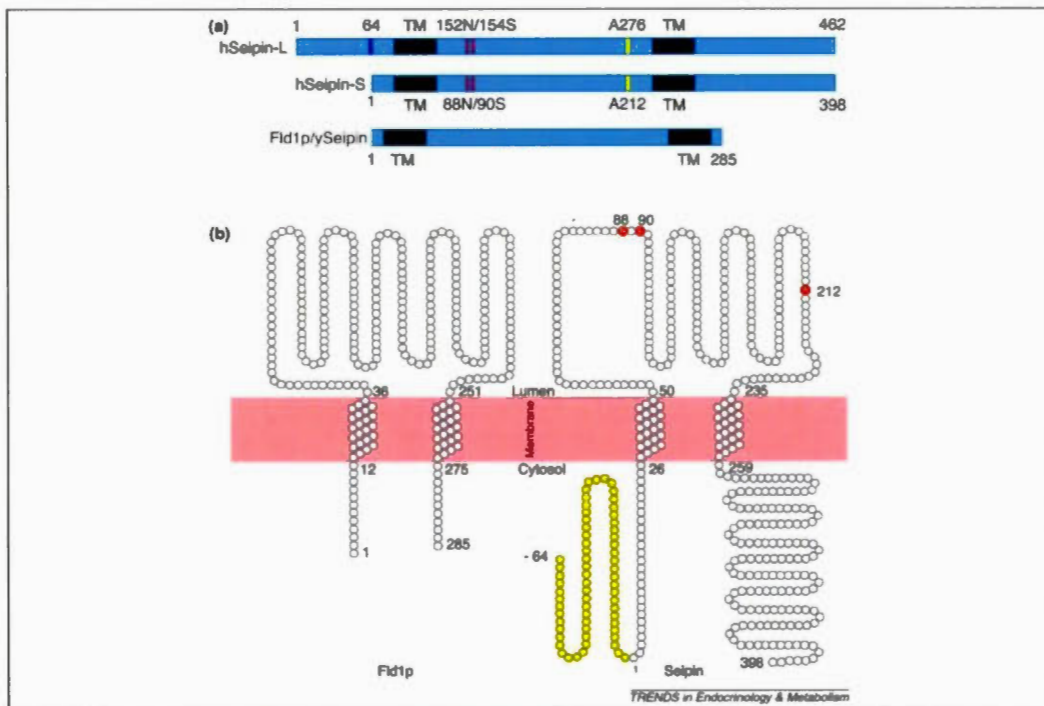
#### b) Fonctions de la Seipine

Aujourd'hui les fonctions exactes de la Seipine restent obscures, du fait notamment qu'il n'existe aucuns motifs connus dans sa séquence susceptible de fournir des indices sur son rôle. Cependant, des données laissent croire qu'elle pourrait avoir un rôle dans l'adipogenèse du fait que l'expression de son ARNm augmente au cours de la différenciation adipocytaire (Chen, W. *et al.*, 2012 ; Payne *et al.*, 2008). Elle pourrait également jouer un rôle dans la formation des GL, du fait de sa localisation sur le RE au niveau des jonctions avec ces GL, (Chen, W. *et al.*, 2012 ; Szymanski *et al.*, 2007) et dans la maturation adipocytaire (Fei, Du et Yang, 2011).

#### c) Rôles présumés de la Seipine

Afin de mieux comprendre la fonction de la Seipine *in vivo*, Cui et ses collaborateurs ont généré le premier modèle de souris Seipine déficientes (Seipine *-/-*) (Cui *et al.*, 2011). Ces auteurs ont constaté que les souris Seipine déficientes reproduisent de nombreux aspects de la BSCL2 humaine à savoir une perte quasi-totale du tissu adipeux, une résistance à l'insuline et une stéatose hépatique sévère. Cependant, la lipogenèse hépatique ne semble pas être affectée chez ces souris de 3 mois car seulement une augmentation de l'expression de SCD1 est observée mais pas celle d'ACC, de SREBP-1c et de DGAT-1. D'autres auteurs ont aussi développé des souris Seipine déficientes montrant une stéatose hépatique sévère, une absence du tissu adipeux (Prieur *et al.*, 2013). Cette étude montre que le traitement des souris Seipine déficientes avec un agoniste de PPAR- $\gamma$  (TZD) induit une diminution de la stéatose hépatique et une formation de tissu adipeux ce qui suggère un lien entre l'absence de la Seipine et la régulation de l'expression de PPAR- $\gamma$  proposant ainsi un rôle

important de la Seipine dans la différenciation adipocytaires (Prieur *et al.*, 2013). Cependant, le rôle de la Seipine dans le développement de la stéatose hépatique reste peu compris. En effet, les études actuelles ne permettent pas d'incriminer l'absence de tissus adipeux ou celle de la Seipine (ou la combinaison des deux) quant à la stéatose hépatique observée chez les souris Seipine déficientes et chez les patients atteints de BSCL2.



**Figure 1.10. Structure de la Seipine humaine et de son homologue chez la levure fld1p.** (a) Représentation schématique de la Seipine humaine, 1) Seipine humaine (isoforme long) (hSeipin-L), Seipine humaine (isoforme court) (hSeipin-S) et de la Seipine de levure (Fld1p/ySeipin). Les résidus mutés sur des sites de glycosylation (88, 90/152, 154) et à différents sites spécifiques (212/276) sont associés au développement de lipodystrophie. TM, Domaine transmembranaire. (b) topologie de la Fld1p et de la Seipine humaine. Les mutants associés à des maladies sont marqués en rouge (Fei, Du et Yang, 2011).



Jusqu'à présent, les études sont controversées concernant le rôle de la seipine dans le foie. En effet, certaines études suggèrent que l'absence de la seipine joue un rôle direct dans l'installation de la stéatose hépatique chez les personnes atteintes de BSCL2 alors que de plus en plus d'études suggèrent que l'absence du tissu adipeux chez ces patients est la cause principale. En effet, une étude a montré que la surexpression de la Seipine induit une diminution du nombre des gouttelettes lipidiques dans des cellules hépatiques humaines (AML-12) (Yang, W. *et al.*, 2013). Cependant, une étude récente a montré que des souris Seipine déficientes spécifiquement dans le foie âgé de 3 mois ne développent pas de stéatose lorsqu'elles sont nourries avec une diète riche en gras (Chen, W. *et al.*, 2014). Les questions qui se posent concernant cette étude sont : 1) Est-ce que ces souris ne peuvent pas développer de stéatose à un âge plus avancé. 2) Est-ce que le choix de la diète n'est pas à l'origine de l'absence de cette stéatose étant donné que le tissu adipeux va tout absorber?

Pour cela, des études supplémentaires doivent être effectuées afin de confirmer ou d'infirmer le rôle de la Seipine dans le foie.

Une forte expression de SCD1 a été mesurée chez les souris Seipine déficientes suggérant une relation fonctionnelle entre SCD1 et la Seipine. De plus, *Magré et collaborateurs* ont rapporté une diminution de l'activité de SCD1 dans les cellules lymphocytaires issues de patients atteints de BSCL ainsi qu'une diminution de la taille des GL dû à un contenu faible en acides gras mono-insaturés (AGMI). Enfin, des études sur des levures ont montré que la délétion de FLD1, orthologue du gène de la Seipine humaine, modifie la taille et la forme des GL (Fei *et al.*, 2008 ; Szymanski *et al.*, 2007 ; Wolinski *et al.*, 2011). En effet, dans différentes cellules mutées, on remarque la présence de GL gigantesques « super-sized » et dans d'autres cellules de nombreuses GL irrégulières regroupées aux alentours du RE (Cartwright *et al.*, 2014 ; Wolinski *et al.*, 2011). Ces études suggèrent que l'apparition de GL gigantesques

dans les cellules mutées de *fld1* serait due au changement de la composition en phospholipides de la membrane de ces structures (Fei *et al.*, 2008). Par contre, l'apparition de GL irrégulières en contact de ER ainsi que la localisation de *fld1* sur le ER prouverait une fonction de cette protéine dans l'organisation des GL ou un rôle dans une éventuelle interaction entre les GL et le RE (Cartwright *et al.*, 2014).

#### 1.7.1.4 Autres causes de la NAFLD

La NAFLD peut être causée par d'autres facteurs comme l'hépatite, certains médicaments et la grossesse (Ress et Kaser, 2016).

Plus de 80% des patients atteints d'hépatite C (HCV) souffrent de stéatose due à une diminution de la  $\beta$ -oxydation, une augmentation de la néoglucogenèse et de la DNL (Ress et Kaser, 2016). Des études récentes ont montré que la HCV bloque la phosphorylation du facteur de transcription Forkhead box protein O1 (FOXO1) induisant une augmentation de la néoglucogenèse et de la DNL via une augmentation des niveaux d'expression de SREBP-1c et de l'acide gras synthase (FAS) (Banerjee *et al.*, 2010 ; Bernsmeier *et al.*, 2014 ; Bose *et al.*, 2014).

Certains médicaments induisent aussi une accumulation réversible de TG hépatiques. Parmi ces médicaments on retrouve les antibiotiques (comme la tétracycline et les glucocorticoïdes, les agents chimiothérapeutiques (comme le tamoxifen), des antiarythmiques, des agents antiviraux, des anti-inflammatoires et les antiépileptiques (**Tableau.1.1**) (Amacher et Chalasani, 2014). Ces médicaments (exemple : acide valproïque) induisent une diminution de la  $\beta$ -oxydation des AG menant à une augmentation intracellulaire des dérivés réactifs d'oxygène (DRO ou ROS) et un épuisement de l'ATP induisant l'installation d'une stéatose microvésiculaire. De plus, dans de nombreux cas, on observe une augmentation de la captation des AG due à

une augmentation de l'expression de FAT/CD36 et/ou une augmentation de la DNL résultant d'une augmentation de l'expression de SREBP-1c ou une diminution des taux d'AMPK (Ress et Kaser, 2016).

Enfin, la stéatose hépatique aigue gravidique est une stéatose rare qui touche 5/100000 femmes en Grande Bretagne et qui apparait aux dernières semaines de la grossesse (Knight *et al.*, 2008). La stéatose hépatique aigue gravidique est due à une défaillance de la  $\beta$ -oxydation dont les mécanismes restent encore aujourd'hui inconnus (Ress et Kaser, 2016).

### 1.7.2 La stéatose hépatique alcoolique

La consommation chronique d'alcool est une cause fréquente de stéatose hépatique. Plus de 90% des consommateurs d'alcool souffrent d'une stéatose alcoolique qui est réversible en cas d'abstinence (Ress et Kaser, 2016 ; Stickel *et al.*, 2003). La consommation chronique de 30g d'alcool pur augmente significativement le risque de maladies chroniques du foie (Ress et Kaser, 2016).

L'alcool est métabolisé dans le foie par deux voies principales, une voie oxydative médiée par les enzymes alcool déshydrogénase (ADH) et aldéhyde déshydrogénase (ALDH) et une voie non oxydative médiée par le cytochrome P450 2E1. L'éthanol est d'abord converti par l'enzyme cytosolique ADH en acétaldéhyde et par la suite métabolisé en acétate par l'enzyme mitochondriale ALDH. Les deux réactions sont dépendantes de la réduction de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) en nicotinamide adénine dinucléotide-hydrogène (NADH) (**Figure.1.11**) (Liu, J., 2014).

**Tableau 1.1 Noms et classes des médicaments et profil de la stéatose associée.**

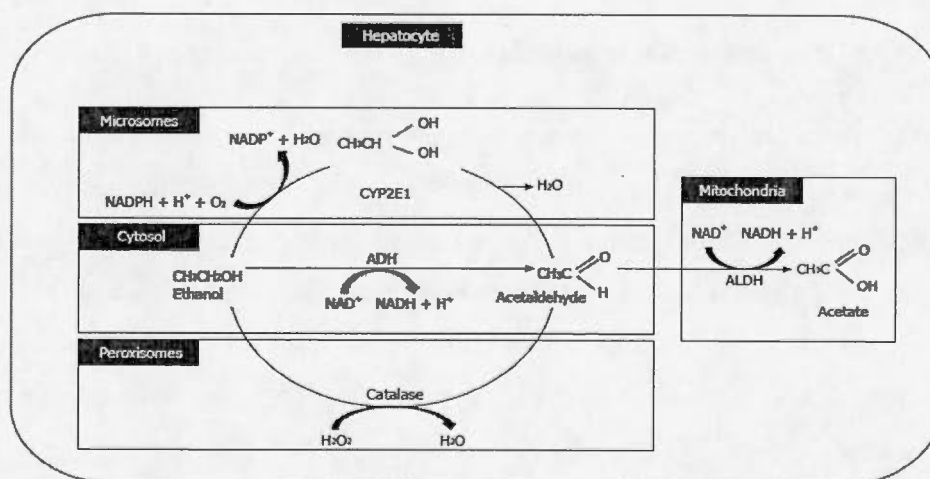
Nom des médicaments et classe	Profil de la Stéatose
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tétracycline (Antibiotique)</li> <li>- Acide Valproïque (Antiépileptique)</li> <li>- Amiodarone (Antiarythmique de classe III)</li> <li>- Glucocorticoïdes (Anti-inflammatoires)</li> <li>- 5-fluorouracile (5-FU) (Anti-cancer)</li> <li>- Huile de margousier (Antiséptique)</li> </ul>	Microstéatose
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acide Acétylsalicylique (Aspirine) (Antalgique)</li> <li>- Tamoxifène (Anti-cancer)</li> </ul>	Macrostéatose
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Didanosine et Stavudine (Agents antirétrovirale)</li> <li>- Méthotrexate (Antimétabolites)</li> </ul>	Profil mixte

Ce résume les principaux médicaments induisant une NAFLD (modifiée de (Amacher et Chalasani, 2014)).

L'acétaldéhyde ainsi formé induit une augmentation de la DNL en augmentant l'expression de SREBP-1c. L'augmentation de la DNL induit une accumulation des intermédiaires des AG comme le malonyl-CoA qui agit sur le transport des AG vers les mitochondries inhibant la CPT1 (Reddy et Hashimoto, 2001 ; You *et al.*, 2002). Via l'acétaldéhyde, l'alcool inhibe aussi l'expression de PPAR $\alpha$ , un facteur de transcription impliqué dans l'oxydation, le transport et l'export des AG (Evans, Barish et Wang, 2004 ; Galli *et al.*, 2001 ; Nanji *et al.*, 2004). Chez des souris PPAR $\alpha$

déficiences, la consommation chronique d'alcool est associée à une augmentation progressive de l'accumulation de TG intra-hépatique due à une diminution de la  $\beta$ -oxydation et des altérations du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) et des chaînes de transport des électrons (Li, H. H. *et al.*, 2014).

De plus, la DNL a aussi été impliquée dans l'accumulation des GL dans la stéatose hépatique alcoolique du principalement à une augmentation de l'expression de SREBP-1c ainsi que celle de ses gènes cibles (You *et al.*, 2002).



**Figure 1.11. Métabolisme de l'éthanol dans les hépatocytes.** Cette figure montre les deux voies du métabolisme de l'éthanol dans les hépatocytes (Liu, J., 2014).

Enfin, il a été montré que la pathogénèse de l'AFLD était associée à une augmentation de la production du TNF- $\alpha$  comme première réponse au dommage du foie (Liu, J., 2014). TNF- $\alpha$ , la cytokine pro-inflammatoire majeure dans l'AFLD, est impliquée dans les réponses inflammatoires, la stéatose (accumulation de gras) et la mort cellulaire des hépatocytes (McClain, Song *et al.*, 2004). Des études sur des souris déficientes pour le récepteur TNF (Tilg et Diehl, 2000) et des études sur des



rats traités avec des anticorps contre TNF- $\alpha$  (Yin *et al.*, 1999), pendant une consommation chronique d'éthanol ont montré que la production accrue de TNF- $\alpha$  joue un rôle important dans la progression de l'AFLD. De plus, il a été montré que l'augmentation de la production de TNF- $\alpha$  augmente la DNL en augmentant l'activité d'ACC et de FAS (Khovidhunkit *et al.*, 2004), en diminuant l'activité de la lipoprotéine lipase (Feingold, Hardardottir et Grunfeld, 1998) et en inhibant la  $\beta$ -oxydation dans les hépatocytes (Nachiappan *et al.*, 1994).

### 1.8 Progression de la stéatose hépatique

La stéatose hépatique progresse de façon similaire que l'on soit dans un cas de NAFLD ou ALFD. En effet, la stéatose hépatique évolue de la simple stéatose, qui est décrite histologiquement comme une accumulation de > 5% de TG dans les hépatocytes en absence d'une inflammation associée, à une stéatohépatite, caractérisée par une lésion des hépatocytes (gonflement induisant une dégénérescence des hépatocytes en présence ou non des corps de Mallory), une inflammation et éventuellement une fibrose (**Figure.1.12**) (Lounis *et al.*, 2015).

La simple stéatose est bénigne. Cependant, la stéatohépatite est la forme de stéatose qui peut progresser en cirrhose et même en carcinome hépatocellulaire (HCC). Un modèle de progression a été proposé pour la première fois par Day et ses collaborateurs appelé le « two hits hypothesis » ou hypothèse à deux étapes (Day et James, 1998). La première étape est une accumulation de TG dans les hépatocytes, alors que la deuxième étape consiste en la présence d'une inflammation associée due à une augmentation de la production de cytokine pro-inflammatoires (Day et James, 1998). Pendant plusieurs années, il a été considéré que les patients avec une simple stéatose hépatique montrent une faible progression vers la cirrhose alors que les patients avec une stéatohépatite montre une progression histologique et clinique

beaucoup plus rapide et cela associée à des complications semblables à une insuffisance hépatique (Musso *et al.*, 2011). Cependant, une étude récente a montré que toutes les formes de stéatose hépatique augmentent significativement le risque de développer un HCC (Yki-Jarvinen, 2014).

## **1.9 Modèles d'animaux pour la stéatose hépatique**

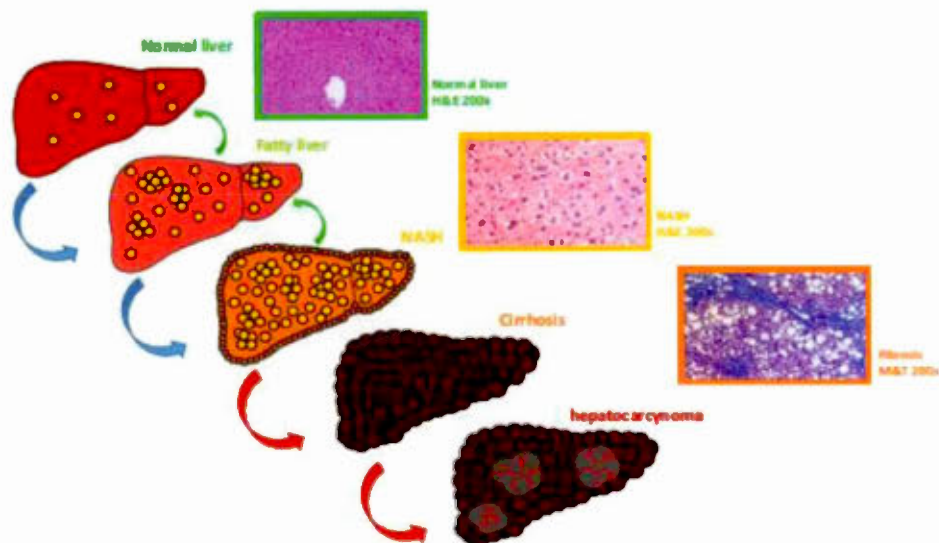
### **1.9.1 Modèles animaux pour la NAFLD**

Les chercheurs tentent de trouver un modèle animal efficace pour la NAFLD, qui imite les différents aspects pathogéniques et histologiques de la NAFLD (Kucera et Cervinkova, 2014). Les modèles animaux utilisés dans la littérature pour étudier la NAFLD sont soit obtenus à la suite d'une diète ou suite à des modifications génétiques (Kucera et Cervinkova, 2014).

#### **1.9.1.1 La NAFLD induite par la diète**

Les modèles nutritionnels de NAFLD peuvent être classés en fonction des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la stéatose hépatique (London et George, 2007). Le premier groupe inclut des modèles caractérisés par une augmentation de la captation des AG et/ou la lipogenèse *de novo* dans le foie (diète riche en AG, diète riche en fructose et en sucrose, diète combinée (riche en gras et en sucre)). Le deuxième groupe inclut les modèles avec une réduction de la sécrétion des lipides et de la  $\beta$ -oxydation dans le foie (diète déficiente en méthionine et en choline, diète déficiente en L-acides aminés).





**Figure 1.12. Représentation schématique de la progression de la stéatose hépatique.** Comparaison schématique de la progression de la stéatose hépatique. Ce schéma présente l'évolution à partir d'un foie normal au carcinome hépatocellulaire, en passant par une simple stéatose, une stéatohépatite et une cirrhose. Les coupes histologiques microscopiques comparent l'histologie d'un foie normal, un foie avec une stéatohépatite (gonflement) et une fibrose (caractérisée par une étape périveinulaire/péricellulaire) (Kanuri et Bergheim, 2013). NASH : stéatohépatite non alcoolique, H&E : Hématoxyline et Éosine, MT : coloration Masson-trichrome (Lounis *et al.*, 2015).

#### a) Diète riche en gras (HFD)

Lieber et ses collègues ont été les premiers à avoir utilisé une diète riche en gras (71% de l'énergie provient des acides gras, 11% des carbohydrates et 18% des protéines) comme modèle pour la stéatohépatite (Lieber *et al.*, 2004). Des rats nourris avec cette diète pendant 3 semaines montrent une élévation du taux plasmatique d'insuline reflétant une insulino-résistance. De plus, ces rats développent une stéatose hépatique caractérisée par une augmentation du contenu hépatique comparé à des rats nourris avec une diète standard (35% de gras, 27% carbohydrates et 18% de protéines). Une autre étude a aussi montré que l'administration d'une diète riche en

gras (60% des calories proviennent des AG) cause une stéatohépatite chez des souris mâles C57BL/6J (Ito, M. *et al.*, 2007). En effet, la suralimentation des souris C57BL/6J induit une obésité (71% des souris deviennent obèses), une augmentation du gras viscéral, une hyperglycémie, une hyper-lipidémie, une intolérance au glucose et une insulino-résistance. Cependant, seulement la moitié des animaux développent une stéatohépatite (Takahashi, Soejima et Fukusato, 2012).

#### b) Diète riche en fructose

Les modèles animaux nourris avec une diète riche en fructose sont considérés comme de très bons modèles pour l'étude du syndrome métabolique.

Des rats Wistar nourris avec une diète riche en fructose (70% vs 0% pour le contrôle) pendant 5 semaines développent une stéatose hépatique micro-vésiculaire majeure, une inflammation intralobulaire, une augmentation de l'index hépatique (poids de foie/ poids total de la souris) et une augmentation de la concentration hépatique de TG comparé aux rats contrôles (Kawasaki *et al.*, 2009). De plus ces rats montrent une augmentation de l'expression de l'interleukine-6 (IL-6) et de TNF- $\alpha$  dans le foie. Chez la souris, l'ajout de 30% de fructose dans l'eau pendant 8 semaines induit aussi une augmentation du contenu hépatique en TG, une stéatose hépatique avancée et un gain de poids considérable par rapport aux souris contrôles (Spruss *et al.*, 2009).

#### c) Diète déficiente en méthionine et choline (MCD)

La diète déficiente en méthionine et choline est une diète qui contient 40% de sucrose et 10% d'AG mais elle est déficiente en méthionine et en choline qui sont des nutriments essentiels pour la  $\beta$ -oxydation et la production de VLDL dans le foie (Takahashi, Soejima et Fukusato, 2012). En effet, les bases azotées sont des donneurs de groupement méthyl (Choline, méthionine...) pour la synthèse des phospholipides (Anstee et Goldin, 2006). Ceci induit un dépôt d'AG dans le foie, un stress oxydatif

et une augmentation de l'expression des interleukines et des cytokines hépatiques induisant ainsi des lésions hépatiques (Takahashi, Soejima et Fukusato, 2012). La diète MCD est la diète qui induit le plus de dommage au foie (inflammation sévère, stress oxydatif, dommage mitochondrial, apoptose et fibrogénèse) comparée aux autres types de diètes (Takahashi, Soejima et Fukusato, 2012). Cependant, l'inconvénient de cette diète est que le profil métabolique du modèle est à l'opposé du profil humain. En effet, les souris nourries avec une diète MCD montrent une perte de poids significative (plus de 20% de perte de poids après 3 semaines de diète, une faible glycémie à jeun, un taux d'insuline et de leptine sérique bas et un taux inchangé ou augmenté d'adiponectine (Takahashi, Soejima et Fukusato, 2012). Afin d'éviter cela, des souris génétiquement modifiées (*ob/ob* et *db/db*) ont été utilisées puis soumises à cette diète.

#### **1.9.1.2 Les animaux génétiquement modifiés**

Plusieurs modèles de souris génétiquement modifiées ont été utilisés pour étudier la NAFLD. Leurs caractéristiques sont résumées dans le **Tableau.1.2** (modifiée de (Willebrords *et al.*, 2015)).

Tableau 1.2. Modèles génétiques de NAFLD.

Espèces	Modèles	Caractéristiques
Souris	<ul style="list-style-type: none"> <li>Leptin déficientes : <i>ob/ob</i> (Lindstrom, 2007)</li> <li>Déficientes aux récepteur de la leptine : <i>db/db</i> (Wortham et al., 2008)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyperphagie</li> <li>- Obésité</li> <li>- IR</li> <li>- Hyper insulinémie</li> <li>- Hyperglycémie</li> <li>- Stéatose Hépatique</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>CD36-/- (Febbraio <i>et al.</i>, 1999)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Augmentation du taux plasmatique d'acides gras et de TG</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>MC4 -/- (Itoh <i>et al.</i>, 2011)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NASH</li> <li>- Obésité</li> <li>- IR</li> <li>- Dyslipidémie</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>SREBP1a+/+ (Shimano <i>et al.</i>, 1996)</li> <li>SREBP1c+/+ (Shimomura <i>et al.</i>, 1999)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stéatose</li> <li>- Hyperphagie</li> <li>- Stéatose</li> <li>- IR</li> <li>- Augmentation des taux de TG</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>PPARa-/- (Reddy, 2001)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stéatose hépatique sévère</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>MTPa-/- (Ibdah <i>et al.</i>, 2001)</li> <li>MTPa+/- (Ibdah <i>et al.</i>, 2005)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stéatose</li> <li>- Stéatose</li> <li>- IR</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AOX -/- (Fan <i>et al.</i>, 1996)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stéatose micro vésiculaire</li> <li>- NASH</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PTEN -/- (Horie <i>et al.</i>, 2004)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stéatose</li> <li>- NASH</li> <li>- HCC</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MAT1A -/- (Martinez-Chantar <i>et al.</i>, 2002)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stéatose</li> <li>- NASH</li> <li>- HCC</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AdipoR1 -/-AdipoR2 -/- (Liu, Y. <i>et al.</i>, 2007)</li> <li>• AdipoR1 -/- /R2 -/- (Yamauchi <i>et al.</i>, 2007)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IR Moyenne</li> <li>- IR Moyenne</li> <li>- Augmentation des TG</li> <li>- Stress Oxydatif</li> <li>- Stéatose</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL6 -/- (Matthews <i>et al.</i>, 2010)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Obésité</li> <li>- Stéatose</li> <li>- NASH</li> <li>- IR</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FXR -/-</li> <li>• LDLr -/-</li> <li>• LDLr -/- /FXR -/- (Kong <i>et al.</i>, 2009)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Métabolisme des lipides et du cholestérol altéré</li> <li>- Stéatose macro vésiculaire</li> <li>- Inflammation</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PECAM1 -/- (Goel <i>et al.</i>, 2007)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stéatose micro vésiculaire</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CBS+/- CBS -/- (Robert <i>et al.</i>, 2005)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inflammation</li> <li>- Fibrose</li> <li>- Stéatose</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• p62+/+</li> </ul> (Simon <i>et al.</i> , 2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cholestérol hépatique élevé</li> <li>- Taux de AGMI élevé</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PNPLA3/148Mvariant</li> </ul> (Smagris <i>et al.</i> , 2015)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Taux de TG élevé</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ApoE2+/+</li> </ul> (Garcia Caraballo <i>et al.</i> , 2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stéatose Hépatique</li> </ul>
<b>Rats</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fa/fa Zucker rat</li> </ul> (Gary-Bobo <i>et al.</i> , 2007)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Obésité</li> <li>- Stéatose Hépatique</li> <li>- IR</li> <li>- Hyperglycémie</li> </ul>
<b>Poissons Zèbres</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GMPS mutant</li> </ul> (Nussbaum <i>et al.</i> , 2013) <ul style="list-style-type: none"> <li>• CBR1+/+</li> </ul> (Pai <i>et al.</i> , 2013) <ul style="list-style-type: none"> <li>• YY1+/+</li> </ul> (Her <i>et al.</i> , 2013) <ul style="list-style-type: none"> <li>• CDIPT -/-</li> </ul> (Thakur <i>et al.</i> , 2011)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Taux de TG élevé</li> <li>- Accumulation de lipides</li> <li>- Accumulation de lipides</li> <li>- Stéatose Hépatique macro vésiculaire-ballooning</li> </ul>

Ce représente les différents modèles animaux génétiquement modifiés qui ont été utilisés pour étudier la NAFLD (modifié de (Willebrords *et al.*, 2015)).

Abréviation : AdipoR, Récepteur de l'adiponéctine; AOX, acyl-coenzyme A oxydase; ApoE, Apo lipoprotéine E; CBS, Cystathionine-b-synthase; CBR, récepteur de la cannabinoïde ; CD36, cluster of differentiation 36; CDIPT, CDP-diacylglycérol-inositol 3-phosphatidyltransférase; FXR, farnesoid X recepteur; GMPS, guanosine



mono phosphate synthétase; HCC, Carcinome hépatocellulaire; HFD, diète riche en gras; IL-6, interleukine-6; IR, résistance à l'insuline; LDL(r) récepteur à la lipoprotéine à faible densité ; MC4, mélanocortine 4; MAT, méthionine adenosyl transférase; MTP, mitochondrial trifunctional protein; NASH, stéatohépatite ; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PECAM, molécule d'adhésion plaquettaire et endothéliale; PNPLA, patatin-like phospholipid domain-containing protein; PTEN, hepatocyte-specific phosphatase and tensin homolog; SREBP, sterol regulatory-element binding protein; TG, triglycéride; YY, ying yang.

## **1.9.2 Modèles d'animaux pour l'AFLD**

### **1.9.2.1 Souris sauvages nourries à l'alcool**

L'AFLD peut être induite de différentes façons chez les animaux. L'alcool peut-être administré par différentes méthodes induisant des effets hépatiques variables (Tableau.1.3).

**Tableau 1.3. Différentes méthodes utilisées pour induire une AFLD.**

Mode d'administration de l'éthanol	Histologie du foie	Taux d'ALT sérique	Aspects techniques
<b>Eau Ad libitum+éthanol</b> (Sun <i>et al.</i> , 2010 ; Tan, Crawford, Jaskowski, Murphy, <i>et al.</i> , 2013).	Foie normal ou stéatose hépatique moyenne	Ne dépasse pas 160IU/L	Facile à administrer
<b>Diète liquide (Lieber-DeCarli) Ad libitum+Éthanol</b> (Han <i>et al.</i> , 2013 ; Hu, M. <i>et al.</i> , 2013).	Stéatose hépatique modérée (micro-stéatose ou macro-stéatose seulement)	Peut atteindre 350IU/L pour des protocoles long (plus que 4 semaines)	Facile à administrer, diète spéciale exigée
<b>Gavage aigu</b> (Bertola, Park et Gao, 2013 ; Zhu <i>et al.</i> , 2011).	Une stéatose hépatique modérée avec inflammation seulement	Une augmentation de 30 à 50 IU/L par rapport aux contrôles	Le gavage est stressant pour les animaux
<b>Ad libitum + gavage</b> (Bertola <i>et al.</i> , 2013 ; Ki <i>et al.</i> , 2010).	Infiltration des neutrophiles dans le foie. Stéatose avec des foyers occasionnels nécrosés mais pas de fibrose	Plus que 270IU/L	Le gavage est stressant pour les animaux
<b>Infusion Intra gastrique</b> (Ji, Chan et Kaplowitz, 2006 ; Ji, Deng et Kaplowitz, 2004).	Stéatose hépatique sévère avec inflammation, nécrose et activation hépatique des cellules satellitaires	Plus que 450IU/L	Spécialiste dans la chirurgie est exigé. Matériaux dispendieux. Un suivi régulier est exigé.

Protocoles utilisées pour l'étude de l'AFLD (modifié de (Wilkin *et al.*, 2016).

### 1.9.2.2 Animaux génétiquement modifiés utilisés pour l'AFLD

Des animaux génétiquement modifiés ont été utilisés pour l'étude de l'AFLD. Ces animaux utilisés sont des principalement des souris transgéniques pour différents gènes inflammatoires ou impliqués dans le métabolisme des lipides. Les principaux modèles utilisés sont résumés dans le suivant (**Tableau.1.4**) (Wilkin *et al.*, 2016).

**Tableau 1.4. Résumé des principaux modèles de souris génétiquement modifiés utilisés pour l'étude de l'AFLD.**

Manipulation génétique	Rôle du gène	Type de dommage du foie
ADH Hépatique déficience, nourries <i>ad libitum</i> diète LdC avec . 1%, 2%, ou 3.5% EtOH (Kaphalia <i>et al.</i> , 2010).	ADH catalyse l'oxydation de l'éthanol, la voie principale du métabolisme de l'alcool lors d'un abus chronique d'alcool.	Pas de stress oxydatif ni d'inflammation. Présence de macro-stéatose en réponse à 3,5% d'éthanol dans la diète chez les souris déficientes comparé aux souris contrôles.
Souris BiP déficientes (heavy chain immunoglobulin binding protein/Grp78) + diète riche en gras <i>ad libitum</i> +4 g alcool/kg poids de souris dans la diète (Han <i>et al.</i> , 2013).	BiP participe de façon directe ou indirecte au repliement et à la maturation des protéines sécrétées et membranaires, à la dégradation des protéines endommagées. Elles servent comme modèles pour le stress du RE.	Les souris BiP déficientes seulement nourries avec la diète supplémentée d'éthanol développent un HCC, suggérant que plusieurs éléments sont nécessaires pour le développement de l'HCC.
Les souris CHOP déficientes nourries par infusion intra gastrique avec une diète riche en gras + 18g/kg à 29g/kg par jour d'alcool pendant 4 semaines (Ji <i>et al.</i> , 2005).	CHOP est un régulateur transcriptionnel impliqué dans l'apoptose induite par un stress du RE.	Les souris CHOP déficientes ne développent pas de stéatose et un taux de Tg hépatiques bas. Les contrôles ont une stéatose importante.

Manipulation génétique	Rôle du gène	Type de dommage du foie
Les souris Cyp2e1 déficientes sont nourries par infusion gastrique avec une diète riche en gras + 14g/kg à 28g/kg par jour d'alcool pendant 4 semaines (Kono <i>et al.</i> , 1999).	L'alcool induit l'expression de Cyp2e1 (cytochrome P450) dans les hépatocytes et semble corrélér avec un dommage hépatique.	Stéatose hépatique moyenne, une faible inflammation et nécrose dans les souris déficientes comparé aux souris contrôles.
Les souris double déficientes Gsta4-4/Ppar- $\alpha$ , sont nourries ad libitum avec 5% éthanol/LdC pendant 40 jours (Ronis <i>et al.</i> , 2015).	Gsta4-4 est une enzyme de détoxification qui élimine les toxines via le glutathion conjugué. Ppar- $\alpha$ est récepteur qui régule l'inflammation et le métabolisme des lipides dans le foie ( $\beta$ -oxydation).	Les souris déficientes développent une stéatose hépatique, une inflammation significative, nécrose et une fibrose.
Des souris Hfe déficientes, nourries avec une diète riche en gras et eau <i>ad libitum</i> + HFD et 20% d'alcool <i>ad libitum</i> (v/v) pendant 8 semaines (Tan, Crawford, Jaskowski, Subramaniam, <i>et al.</i> , 2013).	Modèle utilisé pour la surcharge en fer (Hémochromatose).	Les souris déficientes développent une stéatohépatite sévère avec une fibrose significative.
Souris Hif1a déficientes, 6% d'éthanol dans une diète LdC pendant 4 semaines (Nishiyama <i>et al.</i> , 2012).	HIF est un régulateur de l'hypoxie qui contrôlent l'expression de gènes impliqués dans l'angiogénèse, le développement cellulaire et la survie, le métabolisme du glucose et l'invasion	Les souris déficientes développent une stéatose sévère, un taux sérique élevé de cholestérol et de TG



Manipulation génétique	Rôle du gène	Type de dommage du foie
Souris Lipin1 déficientes nourries avec une diète faible en gras LdC avec ajout d'alcool pendant 4 semaines (Hu, M. <i>et al.</i> , 2013).	La Lipin-1 est requise pour la différenciation adipocytaire et jouerait un rôle de coactivateur transcriptionnel nucléaire des PPAR modulant l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique.	Les souris Lipin 1 déficientes produisent 90 U/L d'ALT avec fibrose après 4 semaines de diète.
Souris Nrf2 déficientes nourries ad libitum avec une diète LdC contenant 2.1% (v/v) d'alcool pendant les 3 premiers jours, 4.2% 3 jours suivants et 6.3% jusqu'à ce que les souris deviennent mourantes (4 à 7 jours) (Lamle <i>et al.</i> , 2008).	Nrf2 est facteur de transcription qui protège contre le stress oxydant.	Le taux d'ALT atteint 3000 U/L associé à une stéatose hépatique avec un nombre élevé de cellules de Kuppfer (macrophages du foie) chez les souris déficientes comparé aux souris contrôles.
Souris PPAR- $\alpha$ déficientes, nourries avec une diète Ldc avec 4% d'éthanol pendant 6 mois (Li, H. H. <i>et al.</i> , 2014)	PPAR- $\alpha$ stimule le catabolisme des acides gras à jeun.	Les souris déficientes développent une fibrose, après une diète avec ajout d'éthanol de 4 à 6 mois, avec une stéatose sévère et une infiltration de cellules inflammatoires.
Les souris SREBP-1c déficientes sont nourries par infusion intra gastrique avec une diète riche en gras + 18g/kg d'alcool par jour puis 29g/kg d'alcool pendant 4 semaines (Ji, Chan et Kaplowitz, 2006).	Les facteurs de transcription SREBPs sont stimulés par l'alcool dans le foie. Ils ont un rôle essentiel dans le métabolisme des TG et du cholestérol dans le foie.	Le taux d'ALT augmente plus que 118IU/L dans les souris sauvages alors que chez les souris Srebp-1c déficiente il ne dépasse pas 80 IU/L.

Manipulation génétique	Rôle du gène	Type de dommage du foie
Les souris Stat3 déficientes sont nourries avec une diète <i>ad libitum</i> LdC avec 5% d'alcool pendant 10 jours, suivi d'un gavage avec 5g/kg d'alcool (Ki <i>et al.</i> , 2010).	Stat3 est impliqué dans l'activation de la cytokine IL-22 qui joue un rôle dans l'homéostasie cellulaire et le contrôle des infections bactériennes et la réparation tissulaire.	Les souris Stat3 déficientes montrent des taux d'AST (450IU/L) et d'ALT (300IU/L) et une micro stéatose.
Les souris TNFR1 déficientes sont nourries par infusion intra gastrique avec une diète riche en gras contenant 18 g/kg à 29 g/kg par jour pendant 4 semaine (Ji, Deng et Kaplowitz, 2004).	TNF- $\alpha$ est sécrétée par les cellules de Kupffer et joue un rôle important dans les premiers stades de l'AFLD. Son effet est arrêté si son récepteur (TNFR1) est déficient.	Les souris TNFR1 déficientes montrent des taux peu élevé d'ALT (45 vs 115 U/L), un faible taux de TG hépatique (0.27 vs 0.34 mg/ mg) et peu de foyers inflammatoires.

Principaux modèles de souris utilisées pour l'étude de l'AFLD (modifié de (Wilkin *et al.*, 2016)).

Abréviations : ADH, alcool déshydrogénase; ALD, stéatose hpatque alcoolique; ALT, alanine aminotransférase; AST, aspartate aminotransférase, BAL, taux sanguin d'alcool; CHOP, protéine homologue de C/EBP (29 kDa); ER, Réticulum endoplasmique; Gsta4-4, glutathione S-transférase A4-4; HCC, carcinome hépato cellulaire; HIF, facteur inductible de l'hypoxie ; LdC, Lieber deCarli; Nrf2, facteur nucléaire érythroïdes 2 ; Ppar, peroxisome proliferator activated receptor; SREBP, sterol response element binding protein; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; WT, sauvages.



## **1.10 Traitements de la stéatose hépatique**

La stéatose hépatique est généralement asymptomatique, surtout durant les premiers stades d'évolution, et pourrait être envisagée seulement à l'aide d'analyses biochimiques sanguines (AST, ALT) (Ress et Kaser, 2016). Durant les dernières années, les avances en matière de traitement pour la stéatose hépatique ont été très lentes et il n'existe pas à ce jour un traitement pharmacologique qui cible aussi bien la stéatose non alcoolique que la stéatose alcoolique. De nos jours, la prise alimentaire non équilibrée (à l'origine de la NAFLD) est parfois associée à une forte prise d'alcool (à l'origine de la AFLD) (Suk, Kim et Baik, 2014). Il serait alors intéressant de trouver une cible thérapeutique ou un médicament qui pourrait agir sur toute forme de stéatose hépatique.

### **1.10.1 Traitements pour la NAFLD**

Aucun traitement n'a été approuvé jusqu'à maintenant pour le traitement de la NAFLD. La stéatose hépatique a été d'abord considérée comme une complication due à d'autres trouble métabolique comme l'obésité ou le diabète, mais actuellement, étant donné que cette maladie peut apparaître chez des personnes qui ne souffrent pas de troubles métaboliques, les chercheurs et les cliniciens considèrent la NAFLD comme une maladie à part entière (Ratziu, Goodman et Sanyal, 2015). Un autre obstacle qui expliquerait l'absence d'une thérapie médicamenteuse efficace est que certaines thérapies pharmacologiques sont efficaces chez les rongeurs et non chez l'humain (Wilkin *et al.*, 2016). Ceci est probablement due aux différences qui existent entre la pathogénèse de la NAFLD chez ces espèces (Ratziu, Goodman et Sanyal, 2015). Cependant, certaines stratégies thérapeutiques sont utilisées actuellement pour ralentir la progression de la maladie.

#### a) Changements du mode de vie et de l'alimentation

Généralement les patients atteints de NAFLD n'ont pas un mode de vie sain. Celui-ci est souvent associé à une alimentation déséquilibrée caractérisée par une consommation élevée de sucre et de gras et une faible quantité de fibres et de vitamines associée à une absence ou réduction d'une activité physique quotidienne (Ratzliff, Goodman et Sanyal, 2015). Il a été démontré dans des études précédentes qu'une faible perte de poids induit une diminution significative du gras hépatique et une amélioration de la réponse à l'insuline (Petersson *et al.*, 2009 ; Promrat *et al.*, 2010). En effet, il a été montré qu'une réduction de 7% du poids total induit une amélioration significative de la stéatohépatite, du dommage du foie (gonflement) et une réduction de l'inflammation lobulaire associée (Promrat *et al.*, 2010).

La perte de poids est généralement induite par une réduction des calories consommées. Pour cela, il est nécessaire d'avoir une alimentation équilibrée en favorisant certains types d'aliments par rapport à d'autres (Suk, Kim et Baik, 2014). En effet, une étude a montré que le régime méditerranéen (fruits, légumes et huile d'olive) réduit le taux de gras hépatique et améliore la réponse à l'insuline indépendamment de la perte de poids (Ryan *et al.*, 2013). Ces observations prouvent l'importance des AGMI et des AG polyinsaturés (PUFA) dans le développement de la NAFLD.

De plus, des études chez l'humain et la souris ont montré que l'activité physique induit une diminution de l'accumulation des acides gras dans le foie, une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une augmentation de la  $\beta$ -oxydation via une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK (Berzigotti, Saran et Dufour, 2016 ; Cho *et al.*, 2016 ; Lavoie et Pihon, 2012).

## b) Thérapies pharmacologiques

A ce jour, il n'existe pas de traitement pharmacologique spécifique pour la NAFLD (Munteanu, Nagy et Mircea, 2016). Cependant, certains médicaments sont utilisés pour la NAFLD (**Tableau.1.5**). De plus, plusieurs pays développés ne recommandent des traitements pharmacologiques qu'aux personnes souffrant d'une stéatohépatite prouvée par une biopsie.

**Tableau 1.5. Principales thérapies pharmacologiques utilisées dans la NAFLD.**

	Thérapies pharmacologiques	Cibles	Effets
<b>Traitements pour la RI</b>	<b>Thiazolinediones (TZD)</b> (Lutchman <i>et al.</i> , 2007).	Active PPAR- $\gamma$	Diminution des AGL augmentation de l'adipogenèse.
	<b>Metformine</b> (Mazza <i>et al.</i> , 2012).	Cible les mitochondries en stimulant la $\beta$ -oxydation et l'activité du pyruvate kinase et diminue la lipogenèse.	Amélioration de la sensibilité à l'insuline, augmentation de la $\beta$ -oxydation. Perte de poids et diminution des lipides hépatique.
	<b>Mimes les Incrélines (Gip, GLP-1)</b> (Kenny <i>et al.</i> , 2010).	Stimulent la production de l'insuline par les cellules $\beta$ pancréatiques	Amélioration de la sensibilité à l'insuline, augmentation de la $\beta$ -oxydation. Perte de poids et diminution du gras hépatique.

<b>Médicaments pour la perte de poids</b>	<b>Orlistat</b> (Zelber-Sagi <i>et al.</i> , 2006).	Inhibe la lipase pancréatique et gastrique.	Perte de 30% du poids. Diminution des transaminases et des lipides hépatiques
	<b>Sibutramine</b> (Araujo et Martel, 2012).	Inhibe la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline.	Augmente la satiété et induit une perte de poids.
	<b>Statines</b> (de Keyser <i>et al.</i> , 2014).	Inhibe la HMG-CoA réductase.	Diminution des taux d'AST et ALT, de la stéatose et de l'inflammation.
<b>Agents cytoprotecteurs et Antioxydants</b>	<b>Pentoxifyllines</b> (Zein <i>et al.</i> , 2011).	Inhibe la synthèse de TNF $\alpha$	Inhibe l'activité des enzymes hépatiques et de l'inflammation associée.
	<b>Acide Ursodésoxycholique (UDCA)</b> (Ratzu <i>et al.</i> , 2011).	Acide biliaire hydrophile qui a des propriétés de Stabilisation de la membrane et de protection.	Diminue le taux d'AST et réduit la stéatose.
	<b>Tochophérol : Vitamine E</b> (Harrison <i>et al.</i> , 2003).	Inhibe l'expression intra-hépatique de TGF- $\beta$ .	Diminution de l'activation des cellules satellitaires, diminution de l'inflammation associée, diminue la stéatose.

	<b>N-acétylcysteine</b> (Pastor <i>et al.</i> , 1997).	Diminue le stress oxydant en augmentant le taux de glutathionne.	Diminue le taux d'AST et ALT protégeant le foie contre le stress oxydant.
<b>Autres thérapies</b>	<b>Antibiotiques et probiotiques</b> (Aller <i>et al.</i> , 2011).	Anti bactériens.	Diminue l'inflammation associée à la stéatose probablement en diminuant le taux de TNF- $\alpha$ et d'interleukines.
	<b>Agoniste du FXR</b> (Mudaliar <i>et al.</i> , 2013).	Ligand de FXR, induisant une augmentation spécifique de plus de 100 fois de l'activité de FXR. Cette augmentation induit une meilleure sensibilité à l'insuline, régule l'homéostasie du glucose, module le métabolisme des lipides et produit un effet anti-inflammatoires.	Augmente la sécrétion d'insuline, du taux de glucose et augmente le stockage des lipides dans les adipocytes.
	<b>Suppléments d'oméga-3</b> (Dasarathy <i>et al.</i> , 2015).	Acides gras polyinsaturés qui auraient des effets bénéfiques pour la santé.	Réduit les lipides hépatiques en augmentant la $\beta$ -oxydation des acides gras et en améliorant la sensibilité à l'insuline.



Thérapies utilisées pour la NAFLD (modifiée de (Martin-Dominguez *et al.*, 2013).

### **1.10.2 Traitements pour l'AFLD**

#### **1.10.2.1 Traitements non pharmacologiques**

La progression de l'AFLD peut être prévenue et réversible si un traitement efficace est effectué lors des premiers stades de développement de la maladie. Comme pour la NAFLD, le problème est que l'AFLD est asymptomatique et que les traitements sont peu efficaces à des stades avancés de la maladie (Suk, Kim et Baik, 2014). Dans les premiers stades de la maladie, il est possible d'éviter la progression et aussi d'inverser la pathologie par des moyens non pharmacologiques. Les traitements non pharmacologiques sont l'abstinence et un régime alimentaire efficace (Suk, Kim et Baik, 2014). En effet, l'abstinence immédiate est l'option de traitement la plus efficace pour les patients atteints d'AFLD (Borowsky, Strome et Lott, 1981 ; Pessione *et al.*, 2003). L'abstinence améliore le pronostic de survie des patients atteints d'AFLD et prévient la progression vers une cirrhose hépatique (Luca *et al.*, 1997 ; Veldt *et al.*, 2002).

De plus, il est essentiel d'associer l'abstinence à une nutrition efficace. En effet la malnutrition est une cause majeure des complications associées à l'AFLD (Suk, Kim et Baik, 2014). Une étude a montré qu'une supplémentation nutritionnelle (une nutrition équilibrée apportant une quantité de calories adéquate et contenant des protéines et des nutriments qui aident à la régénération des hépatocytes) à des patients atteints d'AFLD améliore la stéatose hépatique comparé aux patients atteints d'AFLD et nourries avec une diète classique (Kearns *et al.*, 1992). Une autre étude a montré que l'administration d'une nutrition parentérale équilibrée (2000kcal/jour) à un groupe de patients atteints d'une stéatohépatite sévère induit un taux de mortalité

semblable comparé à des patients traités avec une thérapie médicamenteuse (stéroïdes) (Cabre *et al.*, 2000).

#### 1.10.2.2 Traitements pharmacologiques

Plusieurs traitements pharmacologiques sont utilisés actuellement pour le traitement des AFLD (Suk, Kim et Baik, 2014). Les principaux traitements utilisés sont décrits ci-dessous.

##### a) Les corticostéroïdes

Les corticostéroïdes sont les principaux traitements utilisés pour traiter les stéatohépatites alcooliques sévères. Les corticostéroïdes diminuent l'inflammation en réduisant la transcription des cytokines pro-inflammatoires comme TNF- $\alpha$  et IL-8. Les études sont contradictoires concernant l'efficacité de ces médicaments pour le traitement de l'AFLD où seulement 40% des patients traités avec les corticostéroïdes montrent une amélioration de leur stéatose (Suk, Kim et Baik, 2014).

##### b) Pentoxifylline

La pentoxifylline est un médicament utilisé comme traitement alternatif aux corticostéroïdes. La pentoxifylline inhibe le taux d'adénosine phosphodiesterase et augmente le taux intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) induisant une inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires des macrophages comme TNF- $\alpha$  (Doherty *et al.*, 1991).

### c) Anti-TNF- $\alpha$

Des agents anti-TNF- $\alpha$  (bloqueurs de TNF- $\alpha$ ) ont été développés pour bloquer la cytokine majeure impliquée dans l'AFLD. Deux agents (Infliximab et etanercept) ont été testés comme thérapie de l'AFLD. Cependant, les essais cliniques ont été arrêtés rapidement pour ces deux types de médicaments à cause d'une augmentation significative de taux de mortalité et d'infections dans le groupe traité avec l'infliximab (Suk, Kim et Baik, 2014).

### d) Anti-oxydants

Plusieurs antioxydants (N-acetylcysteine, Metadoxin) ont été utilisés pour le traitement de l'AFLD. Ces médicaments aident les patients atteints d'AFLD en réduisant la progression de la maladie et de l'inflammation associée en diminuant le stress oxydant et la production de cytokines pro inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  (Martin-Dominguez *et al.*, 2013), mais leur efficacité n'est pas encore prouvée pour tous les stades de l'AFLD (Suk, Kim et Baik, 2014).

## 1.11 Problématiques et objectifs

La stéatose hépatique est un problème de santé publique. C'est une maladie qui est en nette progression dans le monde et qui serait à l'origine d'un taux de mortalité élevé. La stéatose hépatique est généralement divisée en deux grands types : la stéatose non alcoolique et la stéatose alcoolique. Il n'existe pas à ce jour de traitement qui agit efficacement contre cette maladie et qui pourrait ralentir la progression de toutes les formes de stéatose.

Il a été démontré dans des études précédentes que l'inhibition de l'activité et de l'expression de SCD1 induit une résistance à l'installation de l'obésité et des troubles

métaboliques associés à l'obésité. En effet, les souris SCD1 déficientes ont une diminution de l'adiposité lorsqu'elles sont nourries avec une diète riche en gras. De plus, au niveau hépatique, l'inhibition de SCD1 induit une diminution de la lipogenèse, une augmentation de la  $\beta$ -oxydation et une diminution de la sécrétion des VLDL.

Au niveau moléculaire, les souris SCD1 déficientes montrent une diminution des gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* et principalement du facteur de transcription SREBP-1c, et une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation. Cependant, les mécanismes moléculaires induisant ces changements moléculaires ne sont pas encore connus.

À la lumière de cela, nous nous sommes intéressés à caractériser le rôle de SCD1 dans le développement et la progression de différents types de stéatoses hépatiques hormis la NAFLD.

Pour répondre à cet objectif, nous avons dans un premier temps caractérisé les mécanismes moléculaires induisant une diminution la lipogenèse *de novo* et l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation dans les souris SCD1 déficientes. SREBP-1c est un facteur de transcription qui active l'expression des gènes lipogéniques (ACC, FAS, SCD1 et SREBP lui-même). L'inhibition de son expression observée dans les souris SCD1 déficientes suggère qu'il existe un rétrocontrôle de SCD1 sur SREBP. Nous avons focalisé notre étude sur la compréhension des mécanismes moléculaires induisant l'inhibition de SREBP dans les hépatocytes en culture où SCD1 a été inhibé et dans des modèles de souris SCD1 déficientes et exprimant l'isoforme de la désaturase synthétisant soit de l'oléate soit du palmitoléate.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à étudier le rôle de SCD1 dans le développement et la progression de la stéatose hépatique dans des hépatocytes déficients en Seipine. Cette protéine est localisée sur le réticulum endoplasmique et

l'inhibition de son expression induit l'installation d'une lipodystrophie congénitale (BSCL2). Dans cette partie de l'étude nous nous sommes intéressés en premier lieu à caractériser le rôle de la Seipine dans le développement de la stéatose hépatique chez ces patients. En deuxième lieu, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'inhibition de SCD1 dans des hépatocytes Seipine déficients dans le but de diminuer la stéatose hépatique associée.

Notre troisième étude a consisté à étudier l'effet de l'inhibition de l'expression de SCD1 dans le développement de la stéatose hépatique alcoolique. Pour cela nous avons utilisé des souris SCD1 déficientes nourries avec une diète faible en gras et en AGMI avec un ajout de 5% d'éthanol pendant 10 jours suivi d'un gavage avec 31% d'éthanol le 11<sup>ème</sup> jour.

**NOTE :** Dans un souci de clarté, les références de chacun des chapitres et de l'annexe apparaissent seulement dans la section des références globales à la fin de la thèse.





## **CHAPITRE II**

### **OLEATE IS ESSENTIAL FOR SREBP-1C ACTIVATION AND MATURATION IN LIVER**

Lounis MA<sup>1,2</sup>, Burhans MS<sup>3</sup>, Bergeron KF<sup>1,2</sup>, Ntambi JM<sup>3</sup> and Mounier C<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Département des sciences biologiques, UQAM, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Centre de recherche Biomed, UQAM, Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup>Departments of Biochemistry and Nutritional Sciences, University of Wisconsin-Madison, 433 Babcock Drive, Madison, WI 53706

**Article soumis à The Journal of Biological Chemistry**

**Juillet 2016**

### Avant-propos

L'objectif de ce chapitre était de caractériser les mécanismes moléculaires induisant une diminution de la lipogenèse *de novo* et une augmentation de la  $\beta$ -oxydation dans les cellules hépatiques déficientes en SCD1. En effet, de nombreuses études ont montré que des souris SCD1 déficientes sont résistantes à l'installation de l'obésité et d'une stéatose hépatique induites par une diète riche en gras. Ces souris montrent une diminution de la lipogenèse *de novo* et une augmentation de la  $\beta$ -oxydation. Cependant, les mécanismes moléculaires à l'origine de ces modifications du métabolisme lipidique dans le foie restent obscurs.

Dans des cellules hépatiques, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de l'expression de SCD1 sur le métabolisme lipidique en absence ou en présence des différents AGMI produits par SCD1 (oléate et palmitoléate). Nous avons étudié dans des cellules HepG2 en culture l'effet des produits de SCD1 sur la régulation de SREBP-1c, un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes lipogéniques (FAS, ACC, SCD1 et SREBP). Afin de confirmer les résultats obtenus sur les cellules en culture, nous avons utilisé des souris SCD1 déficientes et ces même souris mais produisant spécifiquement soit de l'oléate (GLS5) ou soit du palmitoléate (GLS3).

J'ai été impliqué dans toutes les facettes de ces travaux, de la conception à l'élaboration du manuscrit en passant par la réalisation des expériences. J'ai participé à l'élaboration de la totalité des expériences qui ont permis l'élaboration de toutes les figures. Les souris ont été générées dans le laboratoire de Dr JM Ntambi par Maggie S. Burhans et j'ai réalisé les analyses sur les tissus. J'ai participé avec le Dr C Mounier, Dr KF Bergeron et Dr JM Ntambi à l'élaboration des figures, l'analyse des résultats et la rédaction du manuscrit.

## 2.1 Résumé

La stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1) joue un rôle important dans le métabolisme des lipides dans le foie. En effet, les AGMI synthétisés par SCD1 sont préférentiellement incorporés dans les TG et les phospholipides. Les souris SCD1 déficientes montrent des changements métaboliques hépatiques caractérisés par une diminution de la lipogenèse *de novo* et une augmentation de la  $\beta$ -oxydation. Les souris SCD1 déficientes montrent aussi une diminution de l'expression et de la maturation de SREBP-1c, un facteur de transcription qui régule les gènes lipogéniques. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la diminution de la lipogenèse *de novo* et surtout dans la régulation de l'expression et de la maturation de SREBP-1c et que l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation chez les souris SCD1 déficientes demeurent inconnus. Le but de notre étude était d'identifier les mécanismes moléculaires induisant ces modifications. Pour cela, dans un premier temps, nous avons inhibé l'expression de SCD1 dans des cellules HepG2 afin d'évaluer son effet sur le métabolisme des lipides (spécialement de la lipogenèse *de novo* et la  $\beta$ -oxydation). Dans un deuxième temps nous avons étudié l'effet de l'ajout de l'oléate et de la palmitoléate, produits de l'activité de SCD1, sur la maturation de SREBP-1c et la lipogenèse *de novo* sur des HepG2 en culture et en utilisant des souris SCD1 déficientes (GKO) ou déficientes mais produisant spécifiquement de l'oléate (GLS5) ou du palmitoléate (GLS3) hépatique. Nos résultats montrent que l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation observée dans les cellules SCD1 déficientes serait due à une augmentation du taux de PUFA cellulaire. Nous avons aussi montré pour la première fois que l'oléate hépatique se lie directement à SREBP-1c afin de faciliter sa maturation et sa translocation vers le noyau.

**Mots clés :** SCD1, SREBP-1c,  $\beta$ -oxydation, PUFA, Oléate, Lipogenèse *de novo*

## 2.2 Abstract

Stearoyl CoA desaturase1 (SCD1) is a key player in lipid metabolism. SCD1 catalyzes the synthesis of Mono-Unsaturated Fatty Acids (MUFA). MUFA are then incorporated in triglycerides (TG) and phospholipids (PL). Previous studies showed that SCD1 deficiency in mice induces metabolic changes in liver characterized by a decrease in *de novo* lipogenesis and an increase in  $\beta$ -oxidation. Interestingly, SCD1 deficient mice showed a decrease in the expression and maturation of the principal lipogenic transcription factor SREBP-1c. The mechanisms mediating the effect on *de novo* lipogenesis and  $\beta$ -oxidation are still unknown. Using siRNA, we evaluated the role of SCD1 on *de novo* lipogenesis and  $\beta$ -oxidation in HepG2. We also used SCD1 deficient mice and two strains of SCD1 deficient mice, which specifically produce either oleate (GLS5) or palmitoleate (GLS3). We demonstrated that SCD1 deficient hepatocytes displayed increased  $\beta$ -oxidation probably through an increase in cellular PUFA content. We also showed that changes in SREBP-1c expression and maturation in SCD1 deficient cells is due to the lack of oleate. Indeed, oleate supplementation in cultured cells or GLS5 mice partially restores the expression and the maturation of SREBP-1c consequently increasing hepatic *de novo* lipogenesis. Finally, we showed for the first time that oleate is necessary for SREBP-1c translocation into nucleus.

**Key words:** SCD1, SREBP-1c, Oleate, *de novo* lipogenesis;  $\beta$ -oxidation, PUFA.



## 2.3 Introduction

*De novo* lipogenesis (DNL) is the metabolic pathway that synthesizes fatty acids from excess carbohydrates. These fatty acids can then be incorporated into triglycerides (TG) for energy storage. In normal conditions DNL mainly takes place in liver and adipose tissue (Strable et Ntambi, 2010). Palmitic acid (C16:0), the predominant fatty acid generated by FAS, is desaturated by stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) to produce palmitoleate (C16:1) or it can be elongated to yield stearic acid (C18:0). SCD-1 catalyzes the conversion of stearoyl-CoA to oleoyl-CoA, which is a major substrate for TG synthesis. Oleate (C18:1) is formed as a result of desaturation of stearic acid and it is thought to be the end product of *de novo* fatty acid synthesis (Dentin, Girard et Postic, 2005).

DNL is principally mediated by the membrane-bound transcription factor, sterol receptor element binding protein-1c (SREBP-1c), which transactivates several genes involved in lipid synthesis, such as acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), and stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1) (Strable et Ntambi, 2010).

SREBP is initially synthesized as an inactive precursor and formed a complex with SCAP protein into ER membrane. The retention of the SCAP-SREBP complex in the ER membrane is mediated by an increase in the binding of SCAP to the Insig protein and a decrease in the interaction of SCAP with the COPII vesicle-formation proteins Sar1, Sec23 and Sec24 (Rawson, 2003a, 2003b). In presence of high level of sterols, SCAP was able to bind sterols inducing changes in his conformation and the formation of a SCAP-COPII complex in the ER. When SCAP binds to COP the SCAP-SREBP complex travels to the Golgi where SREBP precursor undergoes a sequential two-step proteolytic processing mediated by the site 1 (S1P) and site 2 (S2P) proteases (Li, X. *et al.*, 2014). This cleavage process can lead to the release of the transcriptionally active NH<sub>2</sub>-terminal domain of the protein (~68 kDa) in the Golgi apparatus. Once cleaved, SREBP is translocated into the nucleus where it can

bind to the sterol regulatory element (SRE) sequence present in promoters/enhancers of lipogenic genes (including itself) activating their transcription (Rawson, 2003a, 2003b). Insulin is a positive regulator of SREBP-1c expression through the activation of the AKT/mTORC1 pathway (Bakan et Laplante, 2012). Currently, it is still unclear if SCAP or other proteins involved in SREBP processing play a role as cellular sensor for other fatty acids in similar manner as they do with sterols.

SREBP1c activity alone is not sufficient for the maximal stimulation of glycolytic and lipogenic gene expression. Other transcription factors are also involved in the regulation of *de novo* lipogenesis such as LXR, carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP), and farnesoid X receptor (FXR) (Strable et Ntambi, 2010). AMP-activated protein kinase (AMPK) is also key in the regulation of *de novo* lipogenesis by directly phosphorylating ACC, inducing a decrease in his activity and consequently a reduction in *de novo* lipogenesis. This also leads to an activation of  $\beta$ -oxidation through an increase in malonyl-CoA concentration. In addition, it was shown that AMPK also activates fatty acid oxidation through a direct phosphorylation and activation of CPT-1 and CPT-2 (Kahn *et al.*, 2005).

SCD1 deficient mice are protected from diet-induced obesity after feeding with high fat diet or high carbohydrate diet (Ntambi *et al.*, 2002). SCD1 deficient mice (GKO) show an increase in the expression of genes implicated in  $\beta$ -oxidation (CPT-1 and PPAR $\alpha$ ) and a decrease in the expression of several genes implicated in *de novo* lipogenesis such as FAS and ACC as well as in the expression and maturation of SREBP-1c (Miyazaki, Dobrzyn, Man, *et al.*, 2004 ; Ntambi *et al.*, 2002). In addition, evidences suggest that AMPK plays a role in mediating some of the observed beneficial effects observed in GKO mice (Dobrzyn, P. *et al.*, 2004). In fact, a decrease in the activity of AMPK was shown in GKO mice fed a chow diet. The increase in AMPK phosphorylation was associated with increased phosphorylation of ACC inducing a reduction in his activity (Dobrzyn, P. *et al.*, 2004). As mentioned

above, a lower ACC activity decreases the intracellular level of malonyl-CoA leading to inhibition of CPT-1 and a reduction of  $\beta$ -oxidation (Kahn *et al.*, 2005).

Recently, *Burhans et al* developed models of mice with the ability to restore hepatic oleate (GLS5) or palmitoleate (GLS3) synthesis in a GKO background. The authors took advantages of substrates preferences for the human *SCD5* (oleate) isoform and the mouse *scd3* (palmitoleate) to generate specific MUFA (Burhans *et al.*, 2015). In this study, the authors showed that GLS5 but not GLS3 synthesis increased hepatic lipid accumulation and adiposity compared to GKO mice. A decrease in *de novo* lipogenesis and  $\beta$ -oxidation in white adipose tissue (WAT) is also specifically observed in the GLS5 mice. In another recent study, using the same mouse models, the authors showed that GLS5 but not GLS3 fed lipogenic diet (High fructose low fat diet or high carbohydrate diet) have a reduction in hepatic ER stress and inflammation compared to GKO mice. The authors suggest that oleate specifically induces this effect through the increase in PGC-1 $\alpha$  expression (Liu, X. *et al.*, 2016).

To investigate the molecular mechanism of SREBP-1c maturation and expression in response to SCD1 deficiency, we transfected HepG2 cells with a SCD1 siRNA or used a specific SCD1 inhibitor. We also used GKO, GLS3 and GLS5 mice. We showed here that oleate supplementation in SCD1 deficient hepatocytes increases the expression and maturation of SREBP-1c. We observed an increase in SREBP-1c maturation after oleate supplementation compared to palmitoleate. Our results also suggest that oleate is essential for SREBP-1c maturation facilitating its translocation of into the nucleus where it can activate lipogenic genes expressions. We also showed that SCD1 deficiency in hepatocytes induced an increase in  $\beta$ -oxidation probably through an increase in PUFA content due to a modification of lipid profile after SCD1 deficiency.

## 2.4 Materials and methods

### 2.4.1 Mice

Mice were generated by Dr. Ntambi's laboratory (University of Wisconsin, Madison, USA) and treated according to local ethics committee requirements. The *SCD5* and *scd3* transgenes were crossed into the *Scd1* global knockout (GKO) C57BL/6 background to produce GKO liver-specific *SCD5* (GLS5) and *scd3* (GLS3) transgenic mice, which produce hepatic oleate and palmitoleate respectively (Burhans *et al.*, 2015 ; Liu, X. *et al.*, 2016). We used five mice of 11-13 weeks of age from each group: wildtype, GKO, GLS5 and GLS3. Mice were fed a chow diet since weaning and fasted for 4 hours prior to tissue collection.

### 2.4.2 Cell culture and treatments

HepG2 cells (ATCC) were cultured in EMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent), 100U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Life Technologies). To inhibit SCD1 expression, cells were transfected 24h using DharmaFECT4 reagent (Life Technologies) with scrambled or *SCD1*-targeting siRNA (s12503, Life Technologies) according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). To mimic SCD1 activity, cells were incubated 24h with 100µM bovine serum albumin (BSA) or 100µM oleate-BSA conjugate (2:1 oleate/BSA ratio; Sigma-Aldrich). To inhibit SCD1 activity, cells were treated 24h with 1µM SCD1 inhibitor (A939572, Biofine), as previously described (von Roemeling *et al.*, 2013).

### 2.4.3 Lipid droplet imaging

After siRNA transfection and incubation with oleate, HepG2 cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min. Lipid droplets were stained using Bodipy 493/502 (1 $\mu$ g/ml; Life Technologies) and nuclei using DAPI (1 $\mu$ g/ml; Life Technologies). Fluorescence was visualized with a Nikon A1 confocal microscope. The number and average size of LDs per cell were quantified with *Fiji* software using thresholding function.

### 2.4.4 Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (QPCR)

Total RNA from cells and mice livers were extracted using the Trizol reagent (Life Technologies), according to manufacturer's instructions. Total RNA (500ng) was reverse transcribed (SuperScript II reverse transcriptase; Life Technologies) and quantitative real-time PCR was performed using SYBR Green I Master Mix on a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science). Results are represented as arbitrary units indicating relative expressions based on the comparative Ct ( $\Delta\Delta C_t$ ) method. Data were normalized using the housekeeping gene (*HPRT1*) and expressed as fold changes relative to control samples.

### 2.4.5 Immunoblot analysis

HepG2 cells and mice liver cells were lysed in RIPA buffer containing 0.1mM PMSF and 1% of cOmplete protease inhibitor (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Proteins were denatured at 95°C for 5min, 30 $\mu$ g protein/lane was loaded onto SDS-PAGE and immunoblot analyses were carried out using primary antibodies diluted at 1:1000 in (SREBP-1c (H-160) (cat num: sc-8984, Santa Cruz) , FAS (cat num: sc-55580 ,Santa



Cruz), ACC (Cat Num: 3662, Cell signaling), CD36 (Cat Num: ab78054, Abcam), PPAR $\gamma$  (Cat Num: 2435, Cell Signaling), PPAR $\alpha$  (Cat Num: sc-9000, Santa Cruz), CPT-1 (Cat Num: ab128568, Abcam), GAPDH (Cat Num: 5174, Cell Signaling),  $\alpha$ Tubulin (Cat Num: 2144, Cell Signaling) and HDAC1 (Cat Num: 5356, Cell Signaling). After incubation, the membranes were washed in 1X PBS + 0,1% Tween and incubated with anti-mouse or anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5000; Cell Signaling Technology, Danvers, USA). The immunoreactive bands were revealed by chemiluminescence (Millipore, Billerica, USA) and using a chemi-luminometer (FusionFX, Collegien, France). The *Fiji* software was used to quantify band intensity.

#### 2.4.6 Immunofluorescence

HepG2 cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100. Cells were washed with PBS, blocked with 3% BSA in Tris-buffered saline containing 1% Triton X-100 and then incubated with anti-SCD1 (Abcam; mouse primary 1:200) and anti-SREBP-1c (Santa Cruz Biotech.; rabbit primary 1:50). Cells were washed with PBS and incubated with anti-rabbit Alexa Fluor 488 and anti-mouse Alexa Fluor 647 (Abcam; goat secondary 1:1000). The cells were washed with PBS and images acquired using a Nikon A1 confocal microscope fitted with a 100x oil immersion lens. The nuclei cytoplasm ratio of SREBP-1c expression was then analyzed using the *Intensity Ratio nuclei cytoplasm* macro from *Fiji* software.

#### 2.4.7 Lipid extraction and quantification using gas chromatography

Cells transfected with siRNA (as well as corresponding controls) were trypsinized for 5min, collected and spin at 1200rpm for 5min to pellet hepatocytes. HepG2 cell pellets were washed in 1x PBS. Lipid extractions were conducted using previously described protocols (Bligh et Dyer, 1959 ; Ralston *et al.*, 2014). Samples were analyzed using a 7890B gas chromatography system (Agilent Technologies) with a flame ionization detector, and samples were separated on a J&W DBFFAP fused-silica capillary column (15m, 0.1 $\mu$ m film thickness, 0.1mm i.d.; Agilent Technologies). Fatty acid peaks were identified by comparison with retention times of fatty acid methyl ester standards. To estimate SCD1 activity, we calculated the product-to-precursor fatty acid ratio (i.e., 18:1n9/18:0 and 16:1n7/16:0), as previously reported (Attie *et al.*, 2002 ; Fernandez *et al.*, 2011). Fatty acid data were normalized to protein concentrations for each treatment condition and reported as  $\mu$ g fatty acid per  $\mu$ g/ $\mu$ l protein.

#### 2.4.8 Fatty acid uptake

Uptake of [ $^3$ H]oleate was measured in confluent HepG2 cells as previously described (Labrie *et al.*, 2015 ; Pohl, Ring et Stremmel, 2002 ; Stremmel et Berk, 1986). Briefly, 0.68 $\mu$ Ci of [ $^3$ H] oleate was mixed with 100 $\mu$ M of non-radioactive oleate (Sigma-Aldrich) and dissolved in a 173 $\mu$ M BSA solution free of fatty acids. Cells were incubated with this oleate/BSA solution for 10 min at 37°C. Uptake was stopped by removal of the oleate/BSA solution followed by the addition of ice-cold 1x PBS (5ml) containing 200 $\mu$ M of phloretin and 0.1% BSA (wt/v). After a 2min incubation, cells were washed six times with ice-cold 1x PBS. Cells were then lysed with 2M NaOH and aliquots of the lysate were used for protein concentration and radioactivity measurements. Radioactivity was measured in a TRI Carb 2800TR liquid scintillation

counter after the addition of 10ml Ultima-Gold (Perkin Elmer). Data were expressed as number of counts per minute (CPM) of [ $^3\text{H}$ ] per  $\mu\text{g}$  of protein.

#### **2.4.9 *De novo* lipogenesis**

*De novo* lipogenesis was evaluated by measuring the incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]acetate into lipids, as described previously (Bligh et Dyer, 1959 ; Bolker *et al.*, 1956 ; Jin, Kamanna et Kashyap, 1999). Briefly, post-transfection cells were incubated with 1 $\mu\text{Ci}$  of [ $^{14}\text{C}$ ] acetate for 4h. Cells were then suspended 1x PBS and total cellular lipids were extracted in chloroform/methanol (2:1, v/v). The lipid extract was dried under nitrogen and reconstituted in 100 $\mu\text{l}$  hexane. Radiolabeled lipids were separated by TLC on silica-coated plates using a hexane/diethyl-ether/acetic acid solution (80:20:1, v/v) as a developing solvent (Bligh et Dyer, 1959 ; Bolker *et al.*, 1956 ; Jin, Kamanna et Kashyap, 1999). Lipids were visualized by exposure to iodine vapors and the bands corresponding to authentic lipid standards (TAG and DAG) were scraped into separate vials. Radioactivity was measured and data expressed as CPM of [ $^{14}\text{C}$ ] per  $\mu\text{g}$  of protein.

#### **2.4.10 Protein fatty acid modification assay**

HepG2 cells were inoculated into 6-well plates and incubated overnight at 37°C. Next, these cells were incubated 24h in serum-free medium containing 37 MBq/ml [ $^3\text{H}$ ]  $\text{H}_2\text{O}$  or 37 MBq/ml [9,10- $^3\text{H}$ ]oleate (2.2 TBq/ mmol), or incubated in serum-free medium without labeled fatty acid. The cell lysate was collected and immunoprecipitated with anti-SREBP-1c antibody and protein A Sepharose 4B (Invitrogen) beads. Immunoprecipitates were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Bands corresponding to the SREBP-1c protein were cut out and

radioactivity measured in scintillation liquid in a TRI Carb 2800TR liquid scintillation counter (Perkin Elmer).

#### 2.4.11 Statistical analysis

A Student's t-test was used to compare two groups and a two-way analysis of variance (ANOVA) when more than one factor was evaluated. A  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Unless specified otherwise, data are presented as mean  $\pm$  SD.

### 2.5 Results

#### 2.5.1 SCD1 modulates number and size of lipid droplets

To investigate the effect of SCD1 on lipid droplet (LD) formation, we inhibited the expression of SCD1 in HepG2 cells using an siRNA or incubated cells with oleate. We show that inhibition of SCD1 expression (about 70%; *data not shown*) induces a decrease in the number of LD, both in the absence (40%) and presence (37%) of oleate (**Figure.2.1A&B, left panels**). Interestingly, inhibition of SCD1 expression has no effect on LD size in the absence of oleate, yet induces a 35% size decrease when SCD1-deficient HepG2 cells are stimulated with oleate (**Fig.1B, right panel**).

### 2.5.2 Fatty acid synthesis and uptake decreases in SCD1-deficient hepatocytes

To determine if the LD biogenesis changes in SCD1-deficient HepG2 cells are associated with a modulation of lipid metabolism, we evaluated fatty acid synthesis. We show that inhibition of SCD1 expression induces a 34% decrease in the concentration of intracellular cellular lipids (**Figure.2.2A, top panel**), notably due to lower TG (35% decrease) and DAG (60% decrease) content (**Figure.2.2A, bottom panels**). Concomitantly, expression of key hepatic *de novo* lipogenesis proteins (**Figure.2.2B**), such as SREBP-1c, FAS and ACC is decreased (25%, 12% and 18% respectively). SCD1 knockdown also decreases (by 25%) fatty acid uptake (**Figure.2.3A, top panel**) as well as the expression of the transcription factor PPAR $\gamma$  and the fatty acid translocase CD36 (**Figure.2.3A, bottom panels**).

### 2.5.3 Fatty acid $\beta$ -oxidation and PUFA content increase in SCD1-deficient hepatocytes

We next evaluated fatty acid degradation in SCD1-deficient HepG2 cells via the measurement of  $\beta$ -oxydation markers. SCD1 knockdown in HepG2 cells induces (by 30%) the expression of PPAR $\alpha$  (**Figure.2.3B**), a transcription factor regulating several genes involved in  $\beta$ -oxydation such as CPT-1 (**Figure.2.3B**). Since PPAR $\alpha$  activity can be regulated by PUFA (Desvergne et Wahli, 1999 ; Jump, 2011), we measured the cellular concentration of several key PUFA known to activate this transcription factor. Interestingly, SCD1 inhibition in HepG2 cells increased both total omega-3 (**Figure.2.4A, right panel**) and omega-6 fatty acid content (**Figure.2.4B, right panel**). In particular, we observe a significant increase in eicosapentanoic acid (EPA, 20:5n3) and docosahexanoic acid (DHA, 22:6n3) (**Figure.2.4A, left panel**), and in linoleic acid (AL, 18:2n6), eicosadienoic acid



(EDA, 20:2n6) dihomog- $\gamma$  linoleic acid (DGLA, 20:3n6) and arachidonic acid (AA, 20:4n6) (**Figure.2.4B, left panel**).

#### **2.5.4 Oleate treatment rescues fatty acid content and SREBP-1c expression in SCD1-deficient cells**

To better understand how SCD1 modulates fatty acid synthesis as well as SREBP-1c protein levels, we incubated HepG2 cells with oleate following SCD1 knockdown. As expected, incubation of cells with oleate increases MUFA cellular content especially the 18:1n9. Very interestingly, we showed that addition of oleate also increases the 16:0 content while decreasing the 18:0 level (**Figure.2.5A, top panel**) in agreement with an effect of oleate on *de novo* lipogenesis. This increase in C16:0 and C18:1 is reflected by a general increase in total lipid content in SCD1-deficient cells compared to non-transfected cells (**Figure.2.5A, bottom panel**). Oleate also activates SREBP-1c mRNA (65% increase compared to SCD1-deficient cells and 50% compared to untreated control cells; **Figure.2.5B, top left panel**) and protein expression (25% increase; **Figure.2.5B, middle panel**). More interestingly, an important increase in the mature form of SREBP is also observed upon oleate treatment (50% increase; **Figure.2.5B, bottom right panel**) reflected by the rescue of the nuclear (mature) to total SREBP-1c ratio compared to the SCD1-deficient cells (**Figure.2.5B, bottom left panel**).

#### **2.5.5 Oleate directly modulates SREBP-1c maturation**

We then explored the direct effect of modulating SCD1 expression and activity on SREBP-1c maturation. As observed by immunofluorescence, inhibition of both SCD1 expression (siRNA) and activity (inhibitor) induces a significant decrease of

SREBP-1c expression while as seen by Western blot before, oleate treatment restores it (**Figure.2.6A**). Interestingly, oleate supplementation increases the nuclear localization of mature SREBP-1c in both SCD1-deficient and not-deficient cells (**Figure.2.6B, left panel**). As seen previously using Western blot, the % of nuclear SREBP-1c is rescued by incubation with oleate in siRNA-transfected cells (**Figure.2.6B, top right panel**) and in inhibitor-treated cells (**Figure.2.6B, bottom right panel**). To investigate the mechanism by which oleate increases SREBP-1c maturation and nuclear translocation, we determined if oleate directly associates with the SREBP-1c protein. Radiolabelled-oleate co-immunoprecipitates with SREBP-1c in protein extracts prepared from HepG2 cells (relative to HepG2 cells left untreated or incubated with [ $^3\text{H}$ ]  $\text{H}_2\text{O}$ ; **Figure.2.6C**). Interestingly, treatment with palmitoleate, the other main product of SCD1, has no effect on SREBP-1c expression and nuclear localization (**Figure.2.7A&B**).

#### **2.5.6 Oleate, but not palmitoleate, increases hepatic SREBP-1c maturation and *de novo* lipogenesis in mice**

To confirm that oleate increases SREBP-1c maturation and expression *in vivo*, we used mouse transgenic lines in a global SCD1 knockout (GKO) background that specifically express desaturases in liver leading to the specific production of either oleate (GLS5 line) or palmitoleate (GLS3 line) (Burhans *et al.*, 2015 ; Liu, X. *et al.*, 2016). Confirming our *in vitro* results, SREBP-1c expression is decreased in GKO mice compared to controls. Interestingly, SREBP-1c expression, both total and nuclear, is partially rescued in livers of the GLS5 but not in the GLS3 group (**Figure.2.8A**). In accordance, expressions of lipogenic genes (SREBP-1c, FAS and ACC) are also partially rescued in mouse livers producing oleate, but not palmitoleate (**Figure.2.8B**) confirming the central role of oleate in the maturation of SREBP-1c.

## 2.6 Discussion

SCD1 deficient mice are resistant to obesity and hepatic steatosis in response to HFD. Compare to WT mice, the SCD1 KO mice also present a lower activation of *de novo* lipogenesis and an induction of  $\beta$ -oxidation (Ntambi *et al.*, 2002). However, the molecular mechanisms underlying these effects are still unknown. To characterize these molecular mechanisms, we used HepG2 cells where SCD1 has been inhibited (expression and activity). Our results were validated in SCD1 KO mice and in liver transgenic human SCD5 (GLS5) or mouse *Scd3* mice (GLS3). These mice are able to specifically synthesize either hepatic oleate (GLS5) or palmitoleate (GLS3) (Burhans *et al.*, 2015 ; Liu, X. *et al.*, 2016). We confirm here that SCD1 deficiency decreases lipid droplet formation and *de novo* lipogenesis and increases  $\beta$ -oxidation. We showed that SCD1 deficiency is associated with a higher concentration of cellular PUFA specifically DHA and EPA for  $\omega$ -3 fatty acids and AA for  $\omega$ -6 fatty acids, which probably mediates the activation of  $\beta$ -oxidation. For the first time, our study also reveals that oleate binds to mature SREBP-1c associated with increase maturation and translocation in the nucleus leading to a partial rescue of *de novo* lipogenesis as observed in GLS5 mice. A schematic representation of this phenomenon is presented in **Figure.2.9**.

Compared to control cells, our study reveals that SCD1 deficiency is associated with a decrease in the number and the size of lipid droplets and a decrease in the size of LD. This result suggests that SCD1 may play an important role in the formation of lipid droplet. This hypothesis is consistent with a previous study showing that SCD1 activity is required for LD expansion (Shi *et al.*, 2013). Using *C.elegans*, this study showed that the double mutants *fat-6;fat-7* lacking most desaturases present a lower number and smaller size of lipid droplets compared to WT worms. This effect observed when SCD1 is inhibited is probably the result of a decrease in intra-cellular MUFA. During adipogenesis, the concentration of MUFA raises while the

concentration of SFA decrease. These changes in lipid content during adipocytes differentiation is associated with an increase in SCD1 expression demonstrating a key role for SCD1 in lipid droplet fusion and expansion and not biogenesis (Arisawa *et al.*, 2013). The exact molecular effect of SCD1 in lipid droplet formation remains however to be clarify but it can be explained by the production of MUFA by SCD1 in the ER in the vicinity of enzymes such as diacylglycerol acyltransferase (DGAT), acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT) and microsomal glycerol phosphate acyltransferase GPAT which are involved in TG and CE formation, the principal fatty acids incorporated in the core of lipid droplet (Paton et Ntambi, 2009). This is supported by a recent study showing that SCD1 colocalizes with DGAT2 in the ER (Man *et al.*, 2006). These enzymes including SCD1, may exist as a complex in the ER membrane promoting substrate channeling and fuel partitioning into various metabolic pathways (Paton et Ntambi, 2009).

As observed in SCD1 deficient mice, inhibition of SCD1 expression in cultured hepatocytes also modifies lipid metabolism (Ntambi *et al.*, 2002). Upon SCD1 inhibition in HepG2 cells, we observed a decrease in *de novo* lipogenesis and fatty acid uptake as well as an increase in  $\beta$ -oxidation. Using GC/MS, we showed that SCD1 deficiency is associated with an expected increase in the intra-cellular concentration of SFA (Palmitate, C16:0 and stearate, C18:0). Interestingly, we also observed a clear increase in PUFA concentration both  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6. This increase in both SFA and PUFA concentration could explain the observed increase in  $\beta$ -oxidation observed upon SCD1 inhibition. In fact, a study showed that palmitate is a ligand of PPAR- $\alpha$ , the main activator of  $\beta$ -oxidation (Chakravarthy *et al.*, 2009). The authors also demonstrated that SFA are essential for the activation of PPAR- $\alpha$  leading to transcriptional activation of genes implicated in  $\beta$ -oxidation such as CPT-1 (Chakravarthy *et al.*, 2005). Elevated cellular PUFA (Especially in EPA, DHA and AA) content has been also associated with activation of  $\beta$ -oxidation (Dossi *et al.*, 2014 ; Lopez-Dominguez *et al.*, 2016). In fact, mice fed a diet rich on PUFA (EPA



and DHA) showed a decrease in lipogenesis and an increase in  $\beta$ -oxidation (Dossi *et al.*, 2014). PUFA are able to regulate metabolic genes expressions through a direct binding to peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) (Desvergne et Wahli, 1999 ; Jump, 2011). This activation of PPAR- $\alpha$  by PUFA results in a transcriptional activation genes involved in fatty acid  $\beta$ -oxidation such as CPT-1. These observations are consistent with our study showing that SCD1 deficiency associated with increase concentration of SFA and PUFA, an increase in the expression of PPAR- $\alpha$  and CPT-1 (Berlanga *et al.*, 2014). Interestingly, a study showed decrease in the expression of lipogenic genes especially in the expression and activity of SCD1 and increase in  $\beta$ -oxidation in liver of mice fed a diet enriched in EPA and DHA. Authors suggested that high cellular content on PUFA induced changes in lipid metabolism promoting  $\beta$ -oxidation and inhibiting *de novo* lipogenesis (Flachs *et al.*, 2005).

Recently, study showed a reduction in expression of desaturase 5 and desaturase 6 inducing decrease in cellular EPA and DHA content in mice fed diet enriched in MUFA but they showed the opposite when mice fed diet enriched in SFA (Picklo et Murphy, 2015). These results suggested a regulation of PUFA synthesis by MUFA and SFA but the mechanism remains unknown.

We also showed that SCD1 deficiency in HepG2 cells decreases fatty acid uptake and CD36 and PPAR- $\gamma$  expressions. PPAR- $\gamma$  is a transcription factor implicated in the regulation of adipogenesis and plays an important role in the regulation of fatty acid uptake through the activation of expression of genes implicated in fatty acid uptake such as CD36 (Berlanga *et al.*, 2014). This is consistent with our results suggesting that the observed decrease in fatty acid uptake in SCD1 deficient HepG2 cells is due to a decrease in PPAR- $\gamma$  expression. The decrease in the expression and activity of PPAR-  $\gamma$  could be induced by various mechanisms. Through a decrease in direct ligands of PPAR- $\gamma$  inducing a decrease in his activation through the recruitment of co-repressors such as NCoR (nuclear-receptor co-repressor) and SMRT (silencing



mediator of retinoic-acid and thyroid hormone receptors). An interference with the activity and function of other transcription factors such as NF- $\kappa$ B and AP-1 leading to disruption of their target genes promoters and thereby to transcription repression. Finally, protein modifications such as ubiquitination and phosphorylation have also been shown to suppress the transcription activity of PPAR- $\gamma$  (Zhang, F. *et al.*, 2013).

Our study also reveals that SCD1 deficiency results in a lower expression and maturation of SREBP-1c. SREBP-1c is highly expressed in human and mice liver and is mainly involved in the regulation of genes related to *de novo* lipogenesis such as ACC, FAS, SCD1 and SREBP-1c itself (Shimano *et al.*, 1999 ; Shimomura *et al.*, 1997 ; Shimomura *et al.*, 1998). Interestingly, our study also showed that treating SCD1 deficient cells with oleate or but not palmitoleate increase the expression and the maturation of SREBP-1c. This result is consistent with a previous study showing that in SCD1 deficient mice, SREBP-1c maturation is also inhibited (Miyazaki, Dobrzyn, Man, *et al.*, 2004). In fact, these mice fed a high fructose diet showed a decrease in lipogenesis associated with a lower maturation of SREBP-1c while oleate supplementation in the diet partially restored SREBP-1c activation with no significant increased in lipogenesis (Miyazaki, Dobrzyn, Man, *et al.*, 2004). These observations are in total agreement with our observations made in GLS5 mice showing that synthesis of hepatic oleate restore SREBP-1c maturation partially restoring lipogenesis.

In our study, we showed that oleate supplementation induced increase in C18:1 cellular level but not in C16:1 level due to absence of SCD1 activity in HepG2 cells. However, oleate supplementation induced increase in cellular level of C16:0 probably due to the observed increase in FAS expression through the partial induction of SREBP-1c observed in cells deficient in SCD1 and supplemented with oleate compared to cells deficient in SCD1 alone.

Also, the observed increase in the expression of SREBP-1c is probably due to the auto activation of expression of SREBP-1c through SREBP-1c itself. In fact, nuclear SREBP-1c translocates through the nucleus and binds to SRE domain and activates genes implicated in *de novo* lipogenesis such as FAS, ACC, SCD1 and SREBP-1c itself (Strable et Ntambi, 2010).

The authors indeed suggested that endogenously synthesized oleate is a readily more accessible regulator of lipogenic gene expression than dietary oleate. As us, the authors showed also that oleate over-production by SCD1 is needed to increase SREBP-1c and subsequently expression of lipogenic genes in similar level than in wild type mice (Miyazaki, Dobrzyn, Man, *et al.*, 2004). These observations suggested the existence of other pathways implicated in *de novo* lipogenesis independent of SREBP-1c (Miyazaki, Dobrzyn, Man, *et al.*, 2004). We showed in our study an increase in the cellular level of SFA due to the inhibition of activity of SCD1. In fact, this result could explain the increase in *de novo* lipogenesis independently to SREBP-1c pathway. Previous study also showed that elevated level of intracellular SFA promote the polymerisation and the inactivation of ACC, and consequently the down regulation of *de novo* lipogenesis (Igal, 2011) explaining an activation of lipogenesis independently of SREBP. In addition, the increase in the intracellular level of SFA due to inhibition of SCD1 increases AMPK activity (Scaglia, Chisholm et Igal, 2009). Subsequently, AMPK phosphorylates ACC decreasing its activity and resulting in the inhibition of *de novo* lipogenesis (Kahn *et al.*, 2005). Taking together, this may explain why we only observed a partial restoration of lipogenesis in our models as oleate supplementation (in both HepG2 cells and GLS5 mice) increase the level of MUFA while the level of SFA remains elevated.

In order to explain the mechanism by which oleate can regulate the maturation and expression of SREBP-1c, we incubated HepG2 cells with radiolabeled oleate and quantified the radioactivity in immunoprecipitated SREBP-1c. We showed here that

oleate can binds to SREBP-1c probably facilitating his translocation to the nucleus. In agreement with this, many studies showed that protein modification facilitates the trafficking of proteins through cellular membranes such as modification of Ghrelin and Wnt proteins (Nile et Hannoush, 2016 ; Romero *et al.*, 2010). Indeed, porcupine has been previously identified as the enzyme responsible for lipid modification of the Wnts proteins (Nile et Hannoush, 2016). Wnt3a is fatty acid acylated with palmitoleate, a SCD1 product. Mass spectrometry experiments showed that palmitoleate (C16:1n-7) modified Wnt3a on the Ser209 residue through the action of porcupine (Takada *et al.*, 2006). Porcupine is ER resident protein that belongs to the membrane bound O-acyltransferase (MBOAT) family proteins. We also evaluated the porcupine inhibitor on oleate binding to SREBP-1c. We did not observed any change in the counts of radiolabeled oleate associated to the SREBP-1c band from cells treated with the porcupine compared inhibitor compared to untreated cells (data not shown) suggesting the implication of another enzyme in SREBP-1c acylation. This is not surprising as our data demonstrate that oleate and not palmitoleate is involved in SREBP-1c maturation. Studies are in progress to identify the acylated residue on SREBP-1c and to identify the membrane bound O-acyl transferase (MBOAT) member involved in the acylation of SREBP-1c. In fact, MBOAT family contains 11 distinct members and every one has distinct substrate preference and mechanisms (Masumoto *et al.*, 2015) For this reason, the enzyme responsible of the acylation of SREBP-1c could be another member of MBOAT or another enzyme and they need further future studies to be identified.

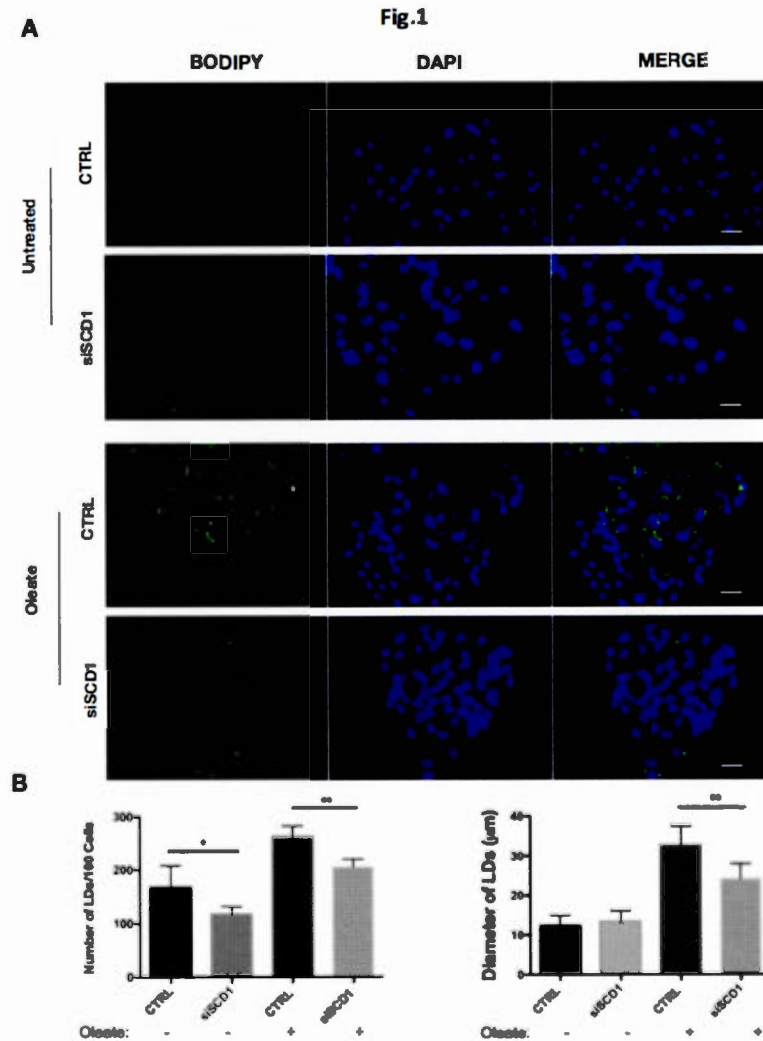
In summary, we demonstrate that SCD1 deficiency in hepatocytes induced decrease in *de novo* lipogenesis and increase in  $\beta$ -oxidation. The increase in  $\beta$ -oxidation is probably due to increase in high PUFA and SF1 cellular content and decrease in MUFA content leading to increase in expression of genes implicated in  $\beta$ -oxidation through the activation of PPAR- $\alpha$ . Interestingly, we demonstrates that oleate is essential for the maturation of SREBP-1c probably via a direct binding of oleate and

that hepatic oleate supplementation partially restores this maturation associated with an increase in lipogenesis. Future work will be needed to explain the exact molecular mechanism underlying the translocation of SREBP-1c into the nucleus.

## **2.7 Acknowledgments**

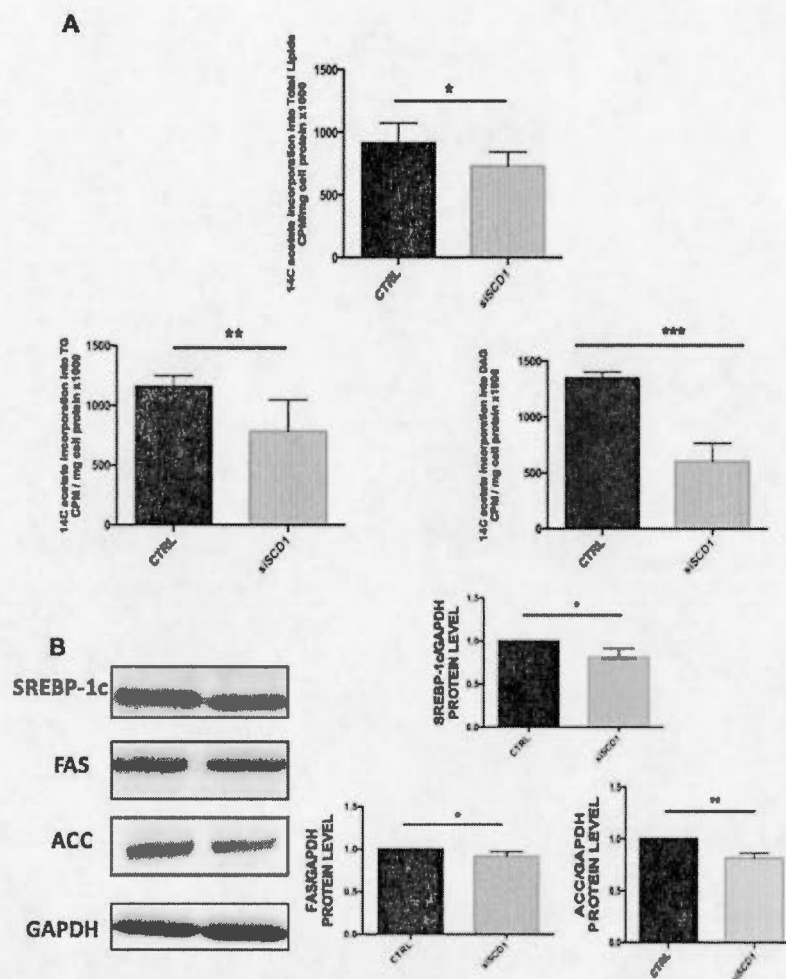
We wish to thank Dr. David M Mutch (University of Guelph, Canada) and his PhD student Jessica C Ralston for the measurement and analysis of cellular lipid content using GC/MS. The Discovery Grants Program of the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) funded this research. MAL is supported by a Fond de Recherche du Québec-Nature et Technologie (FRQNT) fellowship.

## 2.8 Figures

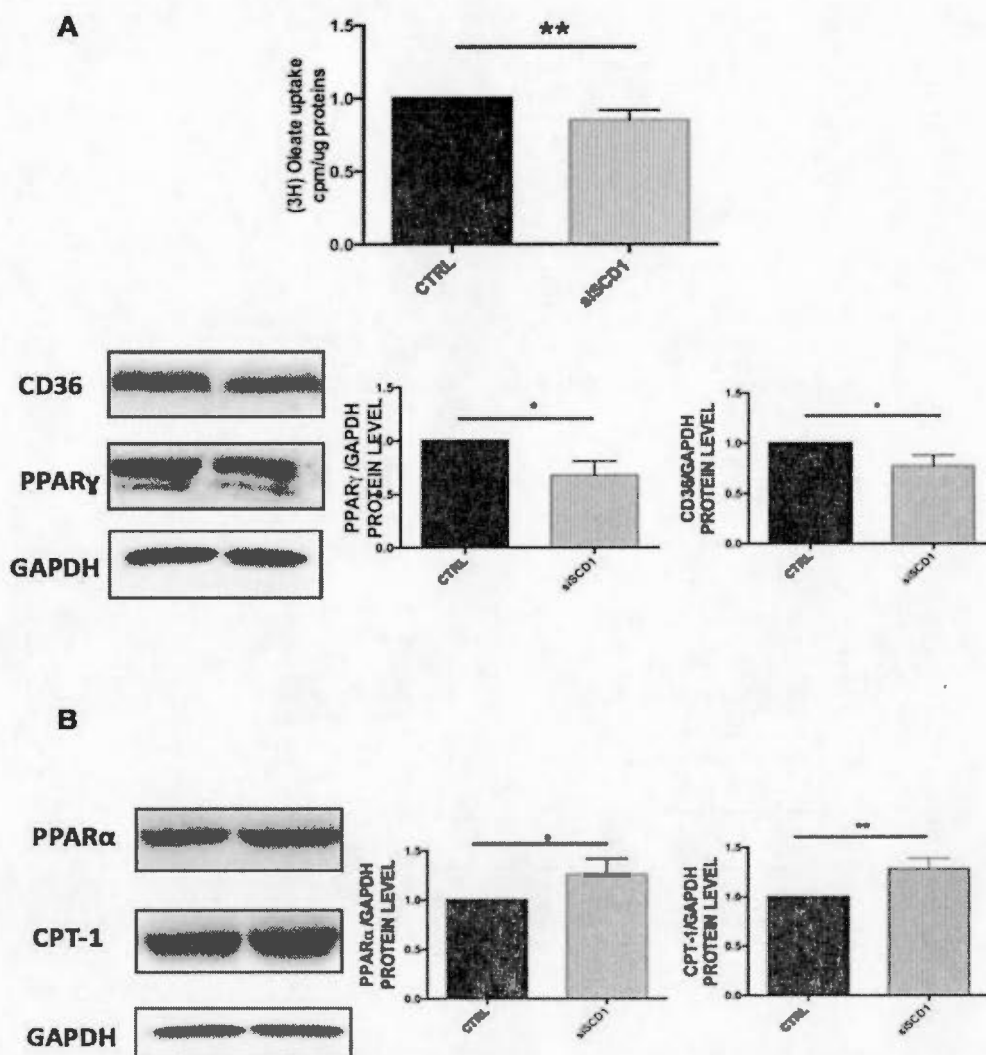


**Figure 2.1. SCD1 knockdown and oleate treatment modulate the number and size of lipid droplets.** (A) HepG2 cells transfected with scrambled (CTRL) or *SCD1*-targeting siRNA (siSCD1), and treated or not with 100μM oleate, were stained with Bodipy 493/503 and DAPI to visualize lipid droplets and nuclei respectively. Bar = 20 μm. (B) The number and size of LDs were quantified. Graphs represent quantification of 5 independent experiments. Results are expressed as number of LDs per 100 cells and diameter of LDs in μm.

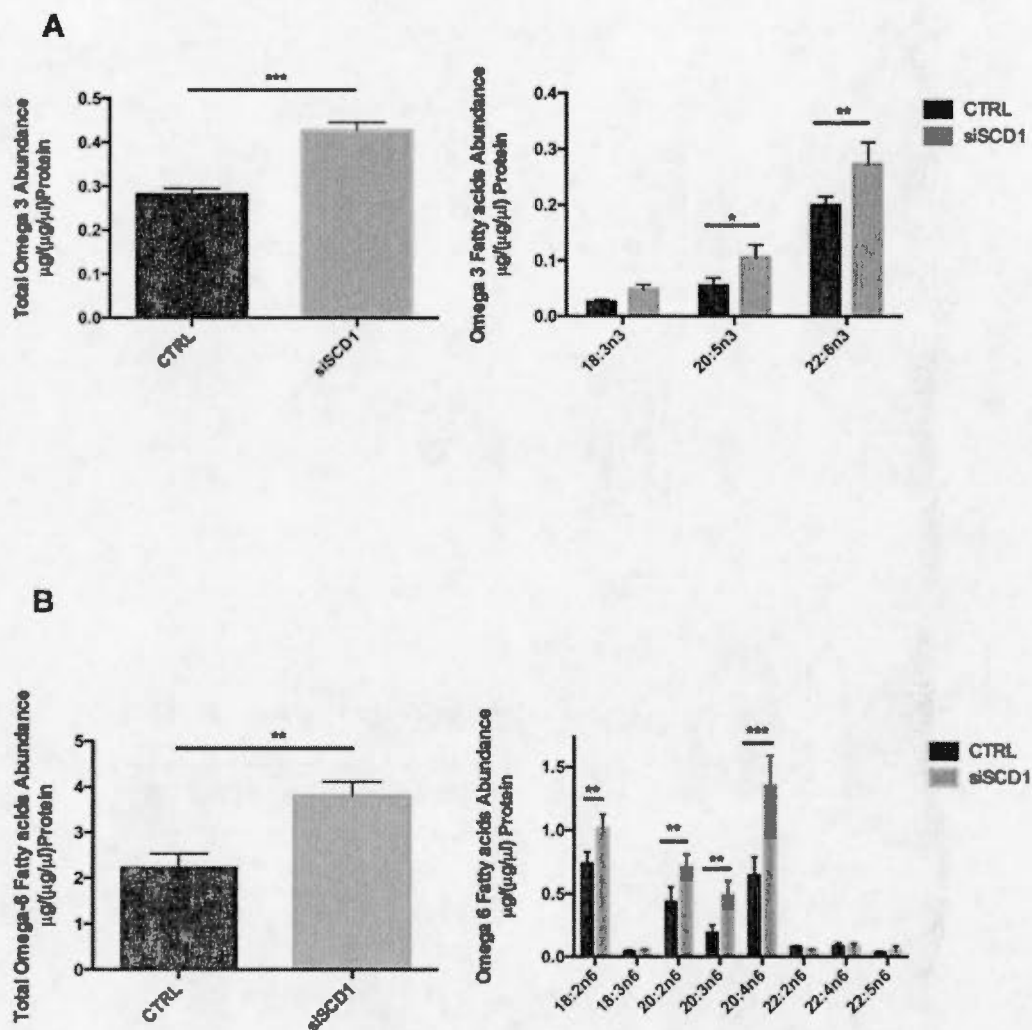




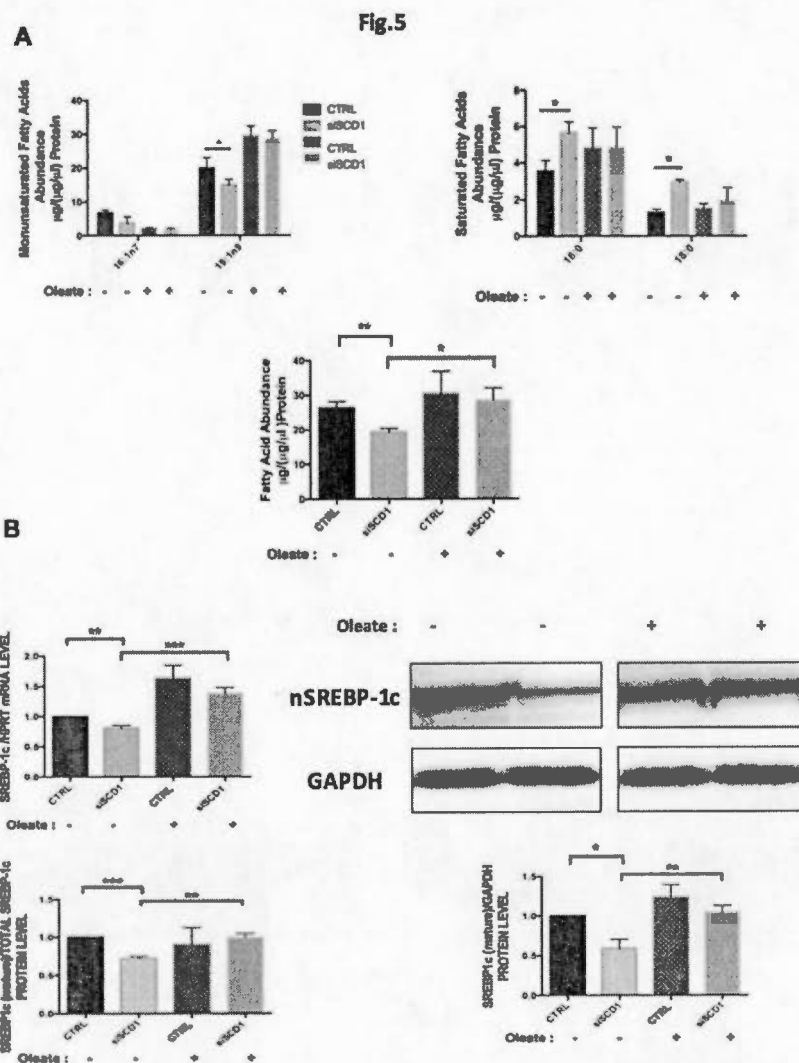
**Figure 2.2. Inhibition of SCD1 expression decreases *de novo* lipogenesis in HepG2 cells.** (A) HepG2 cells transfected with scrambled (CTRL) or *SCD1*-targeting siRNA (siSCD1) were incubated with [ $^{14}$ C]acetate. Incorporated radioactivity was measured in total extracted lipids, triglycerides and diacylglycerol, and expressed as CPM/mg of total protein. (B) The expression of proteins involved in lipid metabolism (SREBP-1c, FAS and ACC) was evaluated by Western blot in SCD1-deficient HepG2 cells. Protein levels measured by densitometry were normalized against GAPDH and presented relative to scrambled control where appropriate. Graphs represent quantification of 5 independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.002$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



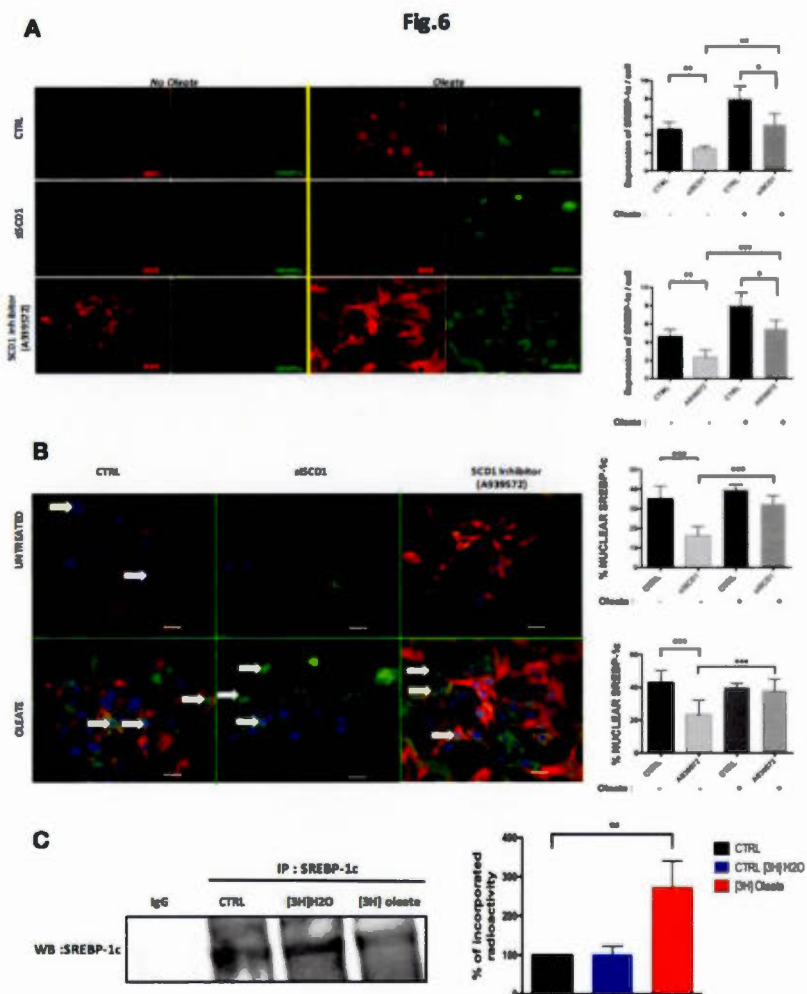
**Figure 2.3. Inhibition of SCD1 expression decreases fatty acid uptake and increases  $\beta$ -oxidation in HepG2 cells.** (A) HepG2 cells transfected with scrambled (CTRL) or *SCD1*-targeting siRNA (siSCD1) were incubated with [ $^3$ H]oleate. Incorporated radioactivity was measured in cell lysates and expressed as CPM/mg of total protein. (B) The expression of proteins involved in fatty acid uptake (CD36 and PPAR $\gamma$ ) and  $\beta$ -oxidation (PPAR $\alpha$  and CPT-1) was evaluated by Western blot in SCD1-deficient HepG2 cells. Protein levels measured by densitometry were normalized against GAPDH and presented relative to scrambled control. Graphs represent quantification of 5 independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.002$ .



**Figure 2.4. PUFA content of SCD1-deficient HepG2 cells.** The cellular PUFA content of HepG2 cells transfected with scrambled (CTRL) or *SCD1*-targeting siRNA (siSCD1) was determined by GC/MS. Total omega-3 (A) and omega-6 (B) PUFA content, as well as fatty acid fractions, were analyzed. The results of 4 experiments are presented as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.002$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

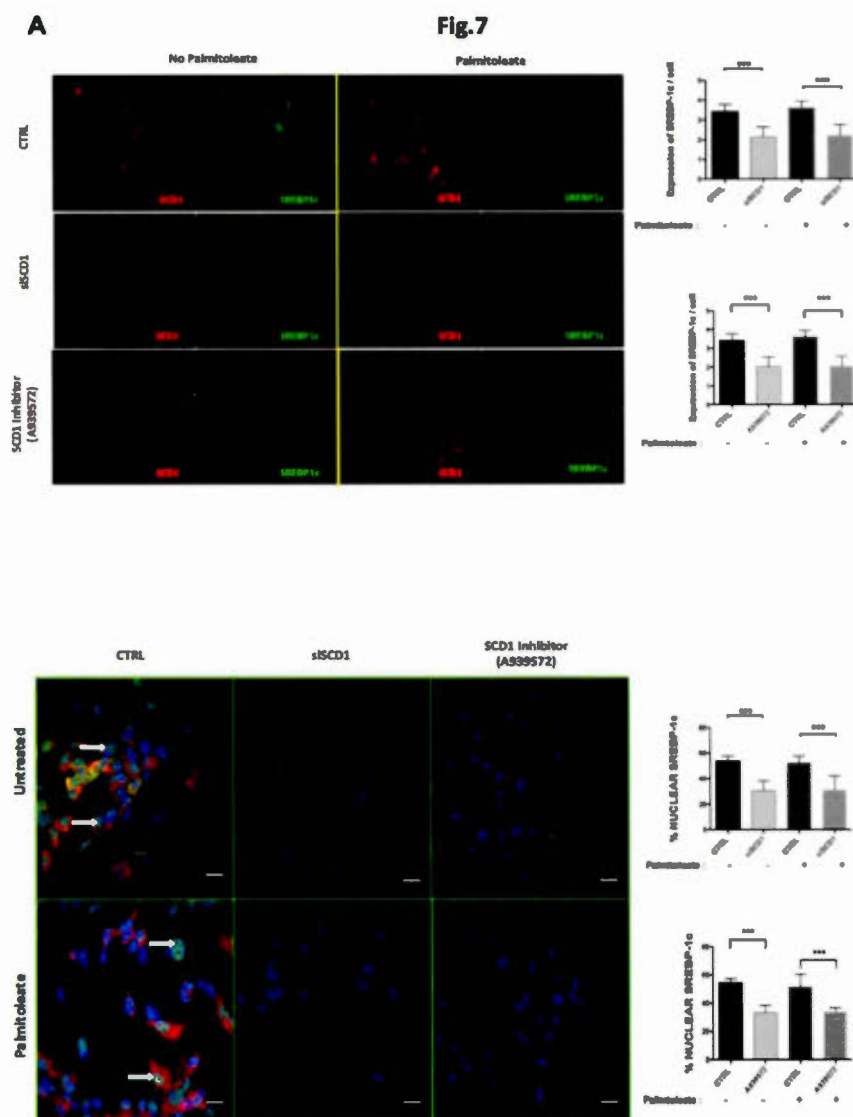


**Figure 2.5. Oleate treatment of SCD1-deficient cells reverses a SREBP-1c expression and maturation defect.** HepG2 cells were transfected with scrambled (CTRL) or *SCD1*-targeting siRNA (siSCD1) and treated or not with oleate. (A) Total fatty acids were extracted and quantified using GC/MS, including monounsaturated fatty acids (MUFA) and saturated fatty acids (SFA). (B) SREBP-1c mRNA and protein expression (mature (nSREBP-1c) form and mature/precursor ratio) were analyzed by QPCR and Western blot respectively. Protein levels evaluated by densitometry were normalized against GAPDH and presented relative to scrambled control. Graphs represent quantification of 5 independent experiments. \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.002$ . \*\*\*  $p < 0.001$ .

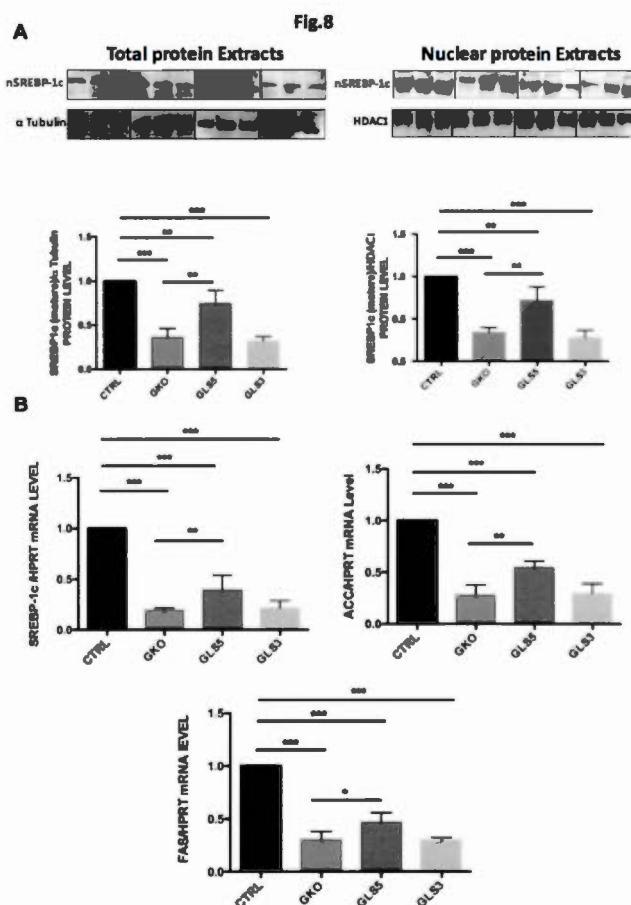


**Figure 2.6. Oleate association increases SREBP-1c nuclear localization and expression.** (A,B) SCD1 (red) and SREBP-1c (green) expression was evaluated by immunofluorescence on HepG2 cells transfected with scrambled (CTRL) or *SCD1*-targeting siRNA (siSCD1), or incubated with a SCD1 inhibitor (A939572), and treated or not with oleate. The nuclear to total SREBP-1c immunofluorescence ratio was also determined (B). Bars = 20  $\mu$ m. (C) SREBP-1c was immunoprecipitated from protein extracts of HepG2 cells incubated with [ $^3$ H]oleate or [ $^3$ H]H<sub>2</sub>O. Incorporated radioactivity was measured in isolated protein bands corresponding to SREBP-1c.



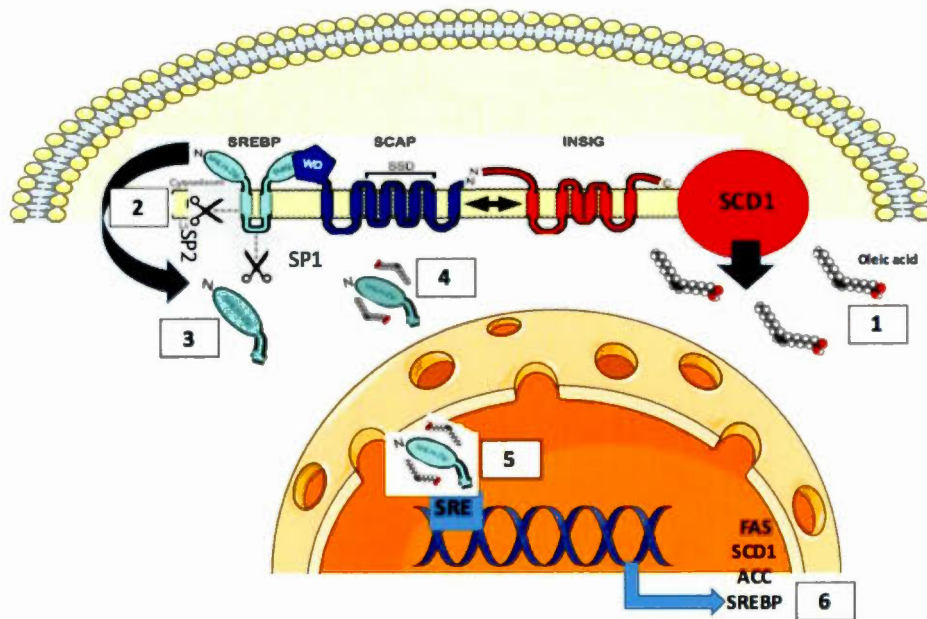


**Figure 2.7. Palmitoleate has no effect on SREBP-1c nuclear localization or expression.** (A,B) SCD1 (red) and SREBP-1c (green) expression was evaluated by immunofluorescence on HepG2 cells transfected with scrambled (CTRL) or *SCD1*-targeting siRNA (siSCD1), or incubated with a SCD1 inhibitor (A939572), and treated or not with palmitoleate. The nuclear to total SREBP-1c immunofluorescence ratio was also determined (B). Bars = 20  $\mu$ m.



**Figure 2.8. Oleate production in the liver partially restores SREBP-1c maturation and lipogenesis in SCD1 knockout mice.** We used the livers of wild type mice, SCD1 knockout mice (GKO) and mice specifically producing oleate or palmitoleate (GLS5 and GLS3 respectively) to evaluate the importance of MUFA in SREBP-1c maturation and *de novo* lipogenesis. (A) Total protein and nuclear extracts were used to evaluate nuclear SREBP-1c expression (nSREBP-1c) using Western blotting. Protein levels measured by densitometry were normalized against  $\alpha$ -Tubulin for total protein extracts and against HDAC1 for nuclear extracts, and presented relative to wild type control (CTRL). (B) Expression of key genes implicated in *de novo* lipogenesis were measured by QPCR, normalized against HPRT and presented relative to wildtype control (CTRL). Graphs represent quantification of 5 independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.002$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Fig.9



**Figure 2.9. Hypothetical action mechanism of oleate in SREBP-1c activation.** SCD1 is essential for cellular oleate synthesis in hepatocytes (1). The presence of oleate induces the translocation of the SREBP-SCAP complex to the Golgi via an unknown mechanism (2). SP1 and SP2 proteases in the Golgi liberate the mature fraction (68 KDa) of SREBP-1c (3). Oleate associates with the mature SREBP-1c, perhaps covalently (acylation), which might induce a change in its protein structure (4). Passage through the nuclear membrane is facilitated for the lipid-modified mature SREBP-1c. It next binds to a sterol response element (SRE) in the enhancer/promoter region of target genes (SCD1, FAS, ACC and SREBP) (5), activating their transcription and leading to an increase in fatty acid synthesis (6).

## **CHAPITRE III**

### **HEPATIC BSCL2 (SEIPIN) DEFICIENCY DISRUPTS LIPID DROPLET HOMEOSTASIS AND INCREASES LIPID METABOLISM VIA SCD1 ACTIVITY**

Mohamed Amine Lounis<sup>1</sup>, Simon Lalonde<sup>1</sup>, Sabri Ahmed Rial<sup>1</sup>, Karl-F. Bergeron<sup>1</sup>,  
Jessica C. Ralston<sup>2</sup>, David M. Mutch<sup>2</sup>, and Catherine Mounier

<sup>1</sup> BioMed Research Center, Biological Sciences Department, University of Quebec in  
Montreal (UQÀM), Montreal, Quebec, Canada

<sup>2</sup> Department of Human Health & Nutritional Sciences, University of Guelph,  
Guelph, Ontario, Canada

**Soumis à Lipids Journal**

**Juin 2016**

### **Avant-propos**

L'objectif de ce chapitre était d'étudier le rôle de la Seipine dans les hépatocytes et de voir l'effet de l'inhibition de SCD1 dans les hépatocytes Seipine déficientes. Le rôle de la Seipine reste obscur à nos jours. Cependant, de nombreuses études ont montré que cette protéine joue un rôle important dans l'adipogenèse et qu'elle aurait un rôle varié dans les cellules non adipocytaires.

Dans des cellules hépatiques nous avons étudié l'effet de l'inhibition de la Seipine dans la formation des gouttelettes lipidiques, dans le métabolisme des lipides la signalisation de l'insuline et le stress du RE. Nous avons confirmé nos résultats en utilisant des souris Seipine déficientes âgées de 3 mois (premiers stades de développement de la stéatose).

Ces travaux ont été réalisés sur des lignées humaines d'hépatocytes (HepG2 : hépatocarcinome humain) et des hépatocytes primaires de rats. Les extraits protéiques et les ARN totaux issus des foies de souris Seipine déficientes et de souris sauvages proviennent du Dr Jocelyne Magré (Université de Nantes, France) et du Dr Xiaoquin Ye (Université de Georgie, USA).

J'ai été impliqué dans toutes les facettes de ces travaux. Simon Lalonde a participé à l'expérience et à l'analyse des figures 3.4 (C), 3.5 (A) et 3.6 (6). Sabri Rial et moi-même avons participé aux expériences qui ont permis l'élaboration de la figure 3.6 (A). Jessica Ralston et le Dr David Mutch (Université de Guelph) ont effectué et analysé les expériences de GC/MS présentées sur la figure 3.5 (D). J'ai participé avec les Dr C. Mounier et Dr Karl Bergeron à l'analyse des résultats et la rédaction du manuscrit.



### 3.1 Résumé

La lipodystrophie congénitale de Beraradinelli Seip (BSCL2) est un désordre induit à la suite d'une mutation autosomale récessive du gène BSCL2 codant pour une protéine appelée Seipine. Les patients atteints de cette maladie ainsi que les souris BSCL2 déficientes, souffrent d'une absence quasi totale du tissu adipeux, d'une organomégalie et développent des désordres métaboliques incluant une insulino-résistance et une stéatose hépatique majeure. Cependant, la fonction de la Seipine reste obscure mais des évidences suggèrent qu'elle aurait des fonctions distinctes dans le tissu adipeux et les autres tissus. Nos résultats suggèrent que la Seipine jouerait un rôle important dans la formation des gouttelettes lipidiques (GLs) dans les hépatocytes. En effet, nous avons observé une augmentation du nombre et de la taille des GLs dans les hépatocytes déficientes en Seipine. Nous avons aussi observé que l'augmentation de l'expression et de l'activité de SCD1 dans les hépatocytes Seipine déficientes serait à l'origine de l'augmentation de la sensibilité à l'insuline, de la captation des acides gras et de la lipogenèse *de novo* observées dans ces cellules. De plus, nous avons observé que l'inhibition de l'expression de SCD1 inverse le phénotype observé dans les hépatocytes Seipine déficientes.

En conclusion, nos résultats suggèrent que la déficience en Seipine dans les hépatocytes induit une augmentation et une expansion des GLs due à une augmentation de l'activité de SCD1 et que l'inhibition hépatique de SCD1 serait une alternative intéressante pour ces patients.

**Mots clés:** BSCL2, Seipine, Gouttelettes lipidiques, SCD1, Lipogenèse *de novo*, Captation des acides gras, Sensibilité à l'insuline

### 3.2 Abstract

Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy (BSCL) is an autosomal recessive disorder. The more severe form, designated BSCL2, arises due to mutations in the *BSCL2* gene. Patients with BSCL2, as well as *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice, have a near total absence of body fat, an organomegaly and develop metabolic disorders including insulin resistance and hepatic steatosis. The function of the Seipin (BSCL2) protein remains poorly understood. Several lines of evidence have indicated that Seipin may have distinct functions in adipose versus non-adipose cells. Here we present evidence that *BSCL2/Bscl2* plays a role in lipid droplet (LD) biogenesis and homeostasis in primary and cultured hepatocytes. Our results show that decreasing *BSCL2/Bscl2* expression in hepatocytes increases the number and size of LDs, as well as the expression of genes implicated in their formation and stabilization. We also show that knocking down *SCD1* expression reverses the phenotype associated with Seipin deficiency. Interestingly, *BSCL2* knockdown induces *SCD1* expression and activity, potentially leading to improved insulin sensitivity, as well as further increasing fatty acid uptake and *de novo* lipogenesis. In conclusion, our results suggest that a hepatic *BSCL2/Bscl2* deficiency induces the increase and expansion of LDs, potentially via increased *SCD1* activity.

### 3.3 Introduction

Berardinelli-Seip syndrome is an autosomal form of congenital generalized lipodystrophy (Garg, 2011) identified by Berardinelli (Berardinelli, W., 1954) from Brazil and Seip from Scandinavia (Seip, 1959). The most severe form of this disorder is Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy type 2 (BSCL2), which is due to a loss of function of the *BSCL2* gene (Agarwal et Garg, 2003, 2004 ; Magre *et al.*, 2001). This disorder is characterized by generalized lipodystrophy, insulin resistance, hypertriglyceridemia and severe hepatic steatosis (Agarwal et Garg, 2003, 2004 ; Magre *et al.*, 2001). In order to understand the function of the Seipin (BSCL2) protein, several groups generated *Bscl2* knockout mice (*Bscl2*<sup>-/-</sup>) (Chen, W. *et al.*, 2012 ; Cui *et al.*, 2011 ; Prieur *et al.*, 2013). These mice develop several metabolic disorders similar to those observed in patients diagnosed with BSCL2 (Chen, W. *et al.*, 2012 ; Cui *et al.*, 2011 ; Prieur *et al.*, 2013). *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice revealed a critical role for Seipin in adipocyte maturation (Chen, W. *et al.*, 2012 ; Payne *et al.*, 2008). It appears that loss of *Bscl2* does not inhibit adipogenesis, but rather abrogates triacylglycerol (TAG) synthesis, thereby preventing the full maturation of adipocytes and subsequently leading to lipodystrophy (Liu, L. *et al.*, 2014). The role of Seipin in non-adipose tissues remains unclear. Humans carrying *BSCL2* mutations, as well as *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice, develop severe hepatic steatosis associated with hepatic failure. Ectopic storage of lipids in the form of intracellular droplets within hepatocytes induces lipotoxicity, which is associated with severe pathological conditions including insulin resistance, pancreatic  $\beta$ -cell failure and non-alcoholic steatohepatitis (NASH), as well as hepatic inflammation (Szendroedi et Roden, 2009 ; Unger, 2002 ; van Herpen et Schrauwen-Hinderling, 2008). In the absence of a functional Seipin protein, hepatic steatosis may be a consequence of a cell-intrinsic effect or a cell-extrinsic effect such as the disappearance of adipose tissue (Gao *et al.*, 2015). *Bscl2* deficiency also has an intriguing impact on insulin sensitivity. Two recently published studies based on insulin and glucose tolerance tests (ITT and GTT, respectively) demonstrated that

*Bscl2*<sup>-/-</sup> mice are insulin resistant (Cui *et al.*, 2011 ; Prieur *et al.*, 2013). In contrast, another group showed insulin hypersensitivity in fasting *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice, suggesting that under specific conditions these mice are not insulin resistant (Chen, W. *et al.*, 2014). TAGs are stored in the cell within lipid droplets (LDs). Several studies have provided evidence that Seipin plays an evolutionarily conserved role in the biogenesis of LDs in various models and tissues, including LDs formation and stabilization (Cartwright et Goodman, 2012 ; Fei, Du et Yang, 2011 ; Fei *et al.*, 2008 ; Prieur *et al.*, 2013 ; Wang, C. W., Miao et Chang, 2014 ; Wolinski *et al.*, 2015 ; Wolinski *et al.*, 2011). Fei and colleagues suggested that the absence of *Bscl2* increases the level of neutral lipids in yeast, leading to the formation of supersized LDs (Fei *et al.*, 2008 ; Fei, Shui, *et al.*, 2011 ; Szymanski *et al.*, 2007). Knocking down *BSCL2* in HeLa and NIH/3T3 cells significantly increases TAG synthesis and storage in LDs, whereas its over-expression has the opposite effect (Fei, Li, *et al.*, 2011). In the salivary gland of *Drosophila*, *Seipin* deficiency promotes the accumulation of LDs by increasing diacylglycerol (DAG) and TAG synthesis and storage (Tian *et al.*, 2011). In hepatic AML12 cells, the overexpression of *Bscl2* inhibits LD formation (Yang, W. *et al.*, 2013). Hence, low Seipin levels are systematically associated with increased TAG synthesis and/or LD formation. However, the particular mechanism by which Seipin participates in LD biogenesis remains unclear.

LD formation begins within ER membrane leaflets (Brasaemle et Wolins, 2012 ; Harris *et al.*, 2011). Recently, Seipin was hypothesized to be a central scaffold protein within the ER (Talukder *et al.*, 2015). In adipocytes, Seipin interacts with the adaptor protein 14-3-3 $\beta$  and may influence cytoskeletal remodeling (Yang, W. *et al.*, 2014). Seipin also interacts with SERCA, an ER Ca<sup>2+</sup>-ATPase regulating lipid storage in adipocytes (Bi *et al.*, 2014). Finally, Talukder and collaborators demonstrated that Seipin can form a complex with AGPAT2 and LPIN1 (Lipin-1) to modulate ER-based lipogenesis and adipogenesis (Talukder *et al.*, 2015). Several reports have implicated the disruption of ER homeostasis, or ER stress, in the development of

hepatic steatosis (Fang *et al.*, 2013 ; Gentile, Frye et Pagliassotti, 2011 ; Puri, P. *et al.*, 2008 ; Puri, V. *et al.*, 2007 ; Rinella *et al.*, 2011 ; Zhang, X. Q. *et al.*, 2014). Any event that leads to a disruption of ER homeostasis, such as excessive protein synthesis, an accumulation of misfolded protein or a change in calcium levels will induce an unfolded protein response (UPR) (Fei, Shui, *et al.*, 2011 ; Zhang, C. *et al.*, 2012 ; Zhang, X. Q. *et al.*, 2014). In mammals cells, the UPR is mediated by three ER proteins: 1) the inositol-requiring transmembrane kinase and endonuclease 1a (IRE1a), 2) the double-stranded RNA (dsRNA)-dependent protein kinase-like ER kinase (PERK), and 3) the activating transcription factor-6 (ATF6) (Rutkowski et Kaufman, 2004). In physiologically normal conditions, these proteins are kept inactive through their association with the ER chaperone glucose-regulated protein 78 (GRP78)/ immunoglobulin-heavy-chain-binding protein. Following the induction of ER stress, GRP78 releases the three UPR proteins in order to manage the accumulation of unfolded proteins, resulting in the activation of PERK, IRE1a, and ATF6 (Zhang, X. Q. *et al.*, 2014).

The present study aimed to analyze the effect of Seipin deficiency on the formation and development of LDs in cultured hepatocytes. *Bscl2/BSCL2* knockdown modified the quantity and morphology of LDs, and affected their growth and fusion. This was associated with an induction of SCD1 expression and activity, as reflected by an increase in the ratio of monounsaturated fatty acids to saturated fatty acids (MUFA/SFA). In these conditions, fatty acid uptake and *de novo* lipogenesis were also activated. In addition, we showed that lowering Seipin levels in hepatocytes increased insulin sensitivity. Our data also revealed that Seipin deficiency phenotype could be reversed with a *SCD1* knockdown. Finally, concomitant to increased lipid storage, *BSCL2/Bscl2* knockdown triggered an activation of ER stress.



### **3.4 Materials and Methods**

#### **3.4.1 Bcl2 knockout extracts**

Liver samples and extracts (mRNA and proteins) from *Bcl2*<sup>-/-</sup> mice were a generous gift from Dr. J. Magré (INSERM, University of Nantes, France) and Dr. Xiaoqin Ye (University of Georgia, USA). Mice were housed and monitored in accordance with protocols approved by their local animal care committees. Fasted (24h) and non-fasted (fed) mice were used to test different physiological conditions (basal versus nutrient-rich, respectively).

#### **3.4.2 Cell culture and transfection**

Primary hepatocytes were isolated from 3-month-old (125g) male Sprague Dawley rats (Harlan Laboratories) using a collagenase perfusion protocol (Harbrecht *et al.*, 2001 ; Harbrecht *et al.*, 1996). Harvested hepatocytes were plated on collagen-coated 12-well plates in DMEM/F12 medium (1:1; Wisent) containing 10% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories) and 1% penicillin-streptomycin-amphotericin B (Life Technologies). Following an overnight incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), cells were washed with 1x phosphate-buffered saline (PBS) and serum-free medium was added for 24h before further treatments. The University of Quebec at Montreal's Animal Care Committee (CIPA) approved all experimental protocols.

HepG2 human hepatocyte cells (ATCC) were cultured in EMEM medium (Wisent) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100U/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin (Life Technologies). At confluence, serum-free medium without antibiotics was applied for 24h.

After 24h in serum-free medium, HepG2 cells and primary rat hepatocytes were transfected using the DharmaFECT4 reagent with either scrambled (CTRL), *BSCL2* and/or *SCD1* (in HepG2 cells), or *Bscl2* (in primary rat hepatocytes) siRNA(s) according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). The next day, cells were treated for 24h with 50 $\mu$ M bovine serum albumin (BSA) or a 50 $\mu$ M oleic acid-BSA conjugate (BSA-oleate) (2:1 oleic acid/BSA ratio; Sigma-Aldrich). For insulin sensitivity experiments, cells were stimulated for 10min with 100nM insulin following siRNA transfection.

### 3.4.3 Lipid droplet imaging

After siRNA transfection and incubation of cells with BSA-oleate, HepG2 cells and primary rat hepatocytes were washed three times with ice-cold 1x PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 30min. LDs were stained for 10min with Bodipy 493/503 (1 $\mu$ g/ml; Life Technologies). Fluorescence was visualized with a Nikon A1 confocal microscope. The number and average size of LDs per cell were quantified using *Image J* software. For time-lapse confocal microscopy, siRNA-transfected HepG2 cells were incubated with BSA-oleate in the presence of 1 $\mu$ g/ml Bodipy 493/502 overnight at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. Z-stacks were acquired every 10min over a 10h period using a Nikon A1 confocal microscope in order to image whole cells. Video frames were analyzed with *Image J* software using the threshold function to outline Bodipy-labelled LDs.

#### **3.4.4 Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)**

Total RNA from tissues and cells were extracted using the Trizol reagent (Life Technologies), according to manufacturer's instructions. Total RNA (500ng) was reverse transcribed (SuperScript II reverse transcriptase; Life Technologies) and quantitative real-time PCR was performed using SYBR Green I Master Mix on a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science). Results are represented as arbitrary units indicating relative expressions based on the comparative Ct ( $\Delta\Delta C_t$ ) method. Data were normalized using housekeeping genes (*Ppia/CyclophilinA* or *HPRT1*) and expressed as fold changes relative to control samples.

#### **3.4.5 Immunohistochemistry**

Rat liver and testis tissues were fixed with 4% paraformaldehyde for 24h at room temperature (RT). After several washes in graded ethanol followed by xylol, samples were embedded in paraffin wax and 5 $\mu$ m thick sections were prepared for immunohistochemistry. HepG2 cells were fixed on slides with 4% paraformaldehyde for 30min at RT. Dewaxed and rehydrated sections, as well as fixed HepG2 cells, were blocked for one hour in 1x PBS containing 1.5% normal goat serum. Samples were incubated with anti-Seipin primary antibody (Santa Cruz Biotechnology, clone L-16; 1:50) overnight at 4°C before using the ImmunoCruz goat ABC staining system (Santa Cruz Biotechnology). Nuclei were stained with Hematoxylin Gill no°3 (Sigma-Aldrich). Rat testis tissue was used as positive control. Tissues processed without primary antibody were used as negative controls.

### 3.4.6 Immunofluorescence

To study SCD1 and Seipin protein colocalization, HepG2 cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100. Cells were washed with PBS, blocked with 3% BSA in Tris-buffered saline containing 1% Triton X-100 and then incubated with anti-SCD1 (Abcam; mouse primary 1:200) and anti-Seipin (Santa Cruz Biotech.; rabbit primary 1:50). Cells were washed with PBS and incubated with anti-mouse Alexa Fluor 488 and anti-rabbit Alexa Fluor 647 (Abcam; goat secondary 1:1000). The cells were washed with PBS and images acquired using a Nikon A1 confocal microscope fitted with a 100x oil immersion lens. Colocalization analysis for Pearson's and Spearman's correlation coefficients were obtained using the Coloc2 analysis plugin in ImageJ software.

### 3.4.7 Immunoblot analysis

After siRNA transfection and incubation with either BSA or BSA-oleate, cells were lysed in RIPA buffer supplemented with cOmplete protease inhibitors and phosphatase inhibitor cocktail 3. Proteins were denatured at 95°C for 5min, 30µg protein/lane was loaded onto SDS-PAGE and immunoblot analyses were carried out using the antibodies listed in **Table 1**. Protein extracts from rat testis, adipose tissue and primary hepatocytes, mouse livers as well as human hepatocyte-hepatocarcinoma HepG2 cells were probed with the anti-Seipin antibody. *Image J* software was used to quantify band intensity.

#### 3.4.8 Lipid extraction and quantification using gas chromatography

Cells transfected with siRNA (as well as corresponding controls) were trypsinized for 5min, collected and spun at 1200rpm for 5min to pellet hepatocytes. HepG2 cell pellets were washed in 1x PBS. Lipid extractions were conducted using previously described protocols (Bligh et Dyer, 1959 ; Ralston *et al.*, 2014). Samples were analyzed using a 7890B gas chromatography system (Agilent Technologies) with a flame ionization detector, and samples were separated on a J&W DBFFAP fused-silica capillary column (15m, 0.1 $\mu$ m film thickness, 0.1mm i.d.; Agilent Technologies). Fatty acid peaks were identified by comparison with retention times of fatty acid methyl ester standards. To estimate SCD1 activity, we calculated the product-to-precursor fatty acid ratio (i.e., 18:1n9/18:0 and 16:1n7/16:0), as previously reported (Attie *et al.*, 2002 ; Fernandez *et al.*, 2011). Fatty acid data were normalized to protein concentrations for each treatment condition and reported as  $\mu$ g fatty acid per  $\mu$ g/ $\mu$ l protein.

#### 3.4.9 Fatty acid uptake

Uptake of [ $^3$ H]oleate was measured in confluent HepG2 cells and rat primary hepatocytes as previously described (Pohl, Ring et Stremmel, 2002 ; Stremmel et Berk, 1986). Briefly, 0.68 $\mu$ Ci of [ $^3$ H]oleate was mixed with 50 $\mu$ M of non-radioactive oleate (Sigma-Aldrich) and dissolved in a 173 $\mu$ M BSA solution free of fatty acids. Cells were incubated with this oleate/BSA solution for 10min at 37°C. Uptake was stopped by removal of the oleate/BSA solution followed by the addition of ice-cold 1x PBS (5ml) containing 200 $\mu$ M of phloretin and 0.1% BSA (wt/v). After a 2min incubation, cells were washed six times with ice-cold 1x PBS. Cells were then lysed with 2M NaOH and aliquots of the lysate were used for protein concentration and radioactivity measurements. Radioactivity was measured in a TRI Carb 2800TR



liquid scintillation counter after the addition of 10ml Ultima-Gold (Perkin Elmer). Data were expressed as number of counts per minute (CPM) of [ $^3\text{H}$ ] per  $\mu\text{g}$  of protein.

#### 3.4.10 *De novo* lipogenesis

*De novo* lipogenesis was evaluated by measuring the incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]acetate into lipids, as described previously (Bligh et Dyer, 1959 ; Bolker *et al.*, 1956 ; Jin, Kamanna et Kashyap, 1999). Briefly, post-transfection cells were incubated with 1 $\mu\text{Ci}$  of [ $^{14}\text{C}$ ]acetate for 4h. Cells were then suspended in 200 $\mu\text{l}$  1x PBS and total cellular lipids were extracted in chloroform/methanol (2:1, v/v). The lipid extract was dried under nitrogen and reconstituted in 100 $\mu\text{l}$  hexane. Radiolabeled lipids were separated by TLC on silica-coated plates using a hexane/diethyl-ether/acetic acid solution (80:20:1, v/v) as a developing solvent (Bligh et Dyer, 1959 ; Bolker *et al.*, 1956 ; Jin, Kamanna et Kashyap, 1999). Lipids were visualized by exposure to iodine vapors and the bands corresponding to authentic lipid standards (FFA, TAG, DAG, CE, and PL) were scraped into separate vials. Radioactivity was measured and data expressed as CPM of [ $^{14}\text{C}$ ] per  $\mu\text{g}$  of protein.

#### 3.4.11 Statistical analysis

When evaluating statistical significance, we used a Student's t-test (two-tailed) to compare two groups and a two-way analysis of variance (ANOVA) when more than one factor was evaluated. A  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Unless specified otherwise, data are presented as mean  $\pm$  SD.

### 3.5 Results

#### 3.5.1 Seipin is expressed in hepatocytes

As Seipin has not yet been shown to play a direct role in the liver, our first aim was to confirm the presence of the Seipin protein in the various hepatic models used in this study. To this end, we performed antibody-based analyses in HepG2 cells (a human hepatocyte-hepatocarcinoma cell line) as well as in rat primary hepatocytes. The testis, a tissue known to express Seipin (Jiang *et al.*, 2014), was used as positive control. An anti-Seipin antibody (**Table 3.1**), detected a band of ~67kD in the rat testis and a major band at ~60kD in the rat adipose tissue, in agreement with previous observations (Jiang *et al.*, 2014). Primary rat hepatocytes also showed a ~60kD band while HepG2 cells displayed a slightly higher band (~61kD), presumably reflecting the fact that human Seipin is 33 amino acids longer. The detected levels of Seipin were lower in adipocytes and hepatocytes compared to testis (**Figure.3.1A, left panels**). A ~60kD band detected in liver extracts of WT mice was absent in liver extracts of *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice (**Figure.3.1A, right panels**), confirming antibody specificity. We used immunohistochemistry to expand and confirm these results. We were able to detect the Seipin protein in HepG2 cells in a pattern consistent with ER localization. Similar observations were made in rat liver and primary hepatocytes (**Supplemental Figure.3.8**).

#### 3.5.2 BSCL2 knockdown alters lipid droplet morphology and size

To evaluate the role of Seipin in vitro, primary rat hepatocytes and HepG2 cells were transfected with a siRNA designed to knockdown *Bscl2*/BSCL2. This approach decreased Seipin protein levels to 54% and 36% in HepG2 cells (**Figure.3.1B, left panels**) and primary rat hepatocytes (**Figure.3.1B, right panels**), respectively. Oleate treatment was then used to increase LD formation. Inhibition of *Bscl2*/BSCL2

expression increased the number (80%) and the size (150%) of LDs, irrespective of the presence of oleate, in both rat primary hepatocytes (**Figure.3.2A**) and HepG2 cells (**Supplementary Figure.3.9**). Live imaging of Seipin-deficient HepG2 cells showed greater LD clustering with at least partial LD fusion, resulting in aggregates of abnormal morphology, and suggested increased LD persistence (**Figure.3.2B**). We analyzed mRNA expression levels of key genes implicated in LD formation, fusion and stability. In both HepG2 cells and the liver of *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice (**Figure.3.2C**), a Seipin deficiency was associated with increased expression of *Plin5/PLIN5* and *Cideal/CIDEA*; genes involved in LD formation and stability, respectively (Wang, H. *et al.*, 2011 ; Wu, L. *et al.*, 2014). In contrast, a decrease in *Atgl/ATGL* expression, a gene known to be involved in lipolysis (Beller *et al.*, 2008 ; Guo *et al.*, 2008 ; Soni *et al.*, 2009), was observed in HepG2 cells and the liver of fasted *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice, but not in fed mice. Together, our data suggest that lowering Seipin levels in hepatocytes increased LD biogenesis.

### 3.5.3 Alteration of lipid droplet homeostasis following *BSCL2* knockdown is concomitant with changes in lipid metabolism

In order to better understand the mechanism underlying the observed increase in LD formation and expansion in Seipin-deficient cells (**Figure.3.2**), we evaluated fatty acid uptake by [<sup>3</sup>H]oleate incorporation into HepG2 cells and primary rat hepatocytes following siRNA transfection. *Bscl2/BSCL2* knockdown caused an increase in fatty acid uptake in both HepG2 cells and primary rat hepatocytes (40%; **Figure.3.3A**). In siRNA-transfected HepG2 cells, elevated fatty acid uptake was associated with increased levels of the PPAR $\gamma$  transcription factor (40%; **Figure.3.3B, top panel**) and at least one of its direct targets, the translocase CD36 implicated in fatty acid transport (He *et al.*, 2011) (80%; **Figure.3.3B, middle panel**). It has recently been shown that Seipin can have an effect on PPAR $\gamma$  nuclear localization and activity

through an interaction with the TAG synthesis enzyme AGPAT2 (Talukder *et al.*, 2015). We therefore investigated AGPAT2 levels in our siRNA-transfected cells. Interestingly, Seipin deficiency led to increased expression of AGPAT2 (40%; **Figure.3.3B, bottom panel**).

To determine if *de novo* lipogenesis was also affected by diminished Seipin levels, we measured [<sup>14</sup>C]acetate incorporation into lipids of siRNA-transfected hepatic cells. A 25% increase in the synthesis of total lipids was observed in HepG2 cells transfected with BSCL2 siRNA (**Figure.3.4A, top panel**). This higher overall synthesis was primarily due to increased synthesis of TAG and DAG (22% and 28% respectively; **Figure.3.4A, bottom panels**). No difference was observed in the other lipid fractions examined, such as free fatty acids, ceramides and cholesterol esters (data not shown). In siRNA-transfected HepG2 cells, elevated *de novo* lipogenesis was also associated with increased expression of several lipogenic enzymes such as ACC, FAS and SCD1, as well as the transcription factor SREBP-1c (**Figure.3.4B**). In addition, an increase in SREBP-1c protein levels was observed in the liver of *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice (**Figure.3.4C**). Interestingly, we also showed a decrease in the expression of proteins implicated in lipolysis (Beller *et al.*, 2008 ; Guo *et al.*, 2008 ; Soni *et al.*, 2009) and  $\beta$ -oxidation (Cheon *et al.*, 2005 ; Louet *et al.*, 2001) (ATGL and PPAR $\alpha$ , respectively) (**Figure.3.4B, bottom panels**), suggesting that inhibition of  $\beta$ -oxidation may contribute to the LD alterations observed in Seipin-deficient cells.

#### 3.5.4 Seipin and SCD1 have opposing effect on LD formation and lipid synthesis

We showed a strong induction of SCD1 expression in Seipin-deficient cultured hepatocytes (**Figure.3.4B**). A similarly result was reported in the liver of *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice (Prieur *et al.*, 2013). We also determined that SCD1 and Seipin colocalize, at

least in HepG2 cells (Manders'  $tM1 = 0.608$ ,  $tM2 = 0.615$ ; **Figure.3.5A**), hinting to a possible functional relationship between these two ER-resident proteins. We therefore tested the effect of *SCD1* deficiency in HepG2 cells using a validated siRNA (**Supplementary Figure.3.10**). Co-transfection of *SCD1* and *BSCL2* siRNAs rescued the Seipin deficiency phenotype, i.e., the number and size of LDs was close to normal when compared to cells transfected with *BSCL2* siRNA alone, irrespective of the presence or absence of oleate (**Figure.3.5B**). The increase in fatty acid uptake (**Figure.3.5C**) and *de novo* lipogenesis (**Figure.3.5D**) observed in Seipin-deficient HepG2 cells was also lost when cells were co-transfected with *SCD1* and *BSCL2* siRNAs. Co-transfected cells exhibited a low lipid uptake and synthesis profile closer to that of cells transfected with *SCD1* siRNA alone. In a similar fashion, we found that the MUFA/SFA ratio is higher in Seipin-deficient hepatocytes compared to non-transfected control HepG2 cells, whereas it tended to be lower in *SCD1*-deficient or co-transfected cells (**Figure.3.5E**). Together, these observations show that Seipin and *SCD1* have opposing effects on LD formation and lipid synthesis, and suggest that Seipin's effect on hepatic lipid synthesis/accumulation is mediated by *SCD1*.

### 3.5.5 Seipin deficiency increases insulin sensitivity

General insulin resistance and hyperglycemia are characteristic of patients with *BSCL2* (Berardinelli, S. D., Fischer et Katz, 1956 ; Cartwright et Goodman, 2012 ; Magre *et al.*, 2001), as well as *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice (Chen, W. *et al.*, 2012 ; Cui *et al.*, 2011 ; Prieur *et al.*, 2013). We therefore evaluated the expression level and the phosphorylation state of key proteins involved in insulin signaling pathways. Surprisingly, our analyses revealed that Seipin deficiency increased insulin sensitivity in both siRNA-transfected HepG2 cells and hepatic protein extracts from *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice. Seipin deficiency was associated with increased phosphorylation of AKT (both Ser473 and Thr308 sites), ERK1/2, mTOR and P70S6K in HepG2 cells stimulated or



not by insulin (**Figure.3.6A**). The levels of AKT (Ser473) and IRS1 (Tyr612) phosphorylation were also increased in liver extracts of *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice (**Figure.3.6B**). Furthermore, we noted that the expression of gluconeogenesis markers such as PEPCK and GK was increased, while G6P expression was decreased, in *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice (**Figure.3.6C**). Enhanced gluconeogenesis increases intracellular glucose concentration and can induce a reduction in AMPK activity (Foretz *et al.*, 1998 ; Foufelle et Ferre, 2002), which could explain the decrease in phosphorylated AMPK we observe in *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice (**Figure.3.6B**).

We then analyzed the effect of *BSCL2* knockdown on physiological responses activated by insulin. We stimulated siRNA-transfected rat primary hepatocytes with insulin and measured both fatty acid uptake and *de novo* lipogenesis. In accordance with initial observations (**Figure.3.3A**), Seipin deficiency increased both fatty acid uptake and lipogenesis. However, the presence of insulin further stimulated fatty acid uptake (25% compared to *BSCL2* siRNA-transfected cells without insulin) (**Figure.3.6D**) and *de novo* lipogenesis (35% total lipids, compared to *BSCL2* siRNA-transfected cells without insulin) (**Figure.3.6E**). As previously observed (**Figure.3.4A**), increased *de novo* lipogenesis primarily stemmed from increased TAG and DAG synthesis (**Figure.3.6E**), as the levels of others lipid classes did not vary (*data not shown*). These data suggest that in cases of Seipin deficiency, hepatic lipid uptake and synthesis as well as gluconeogenesis are increased, probably aggravating the *BSCL2* phenotype and contributing to hepatic dysfunction.

### 3.5.6 Seipin deficiency increases the expression of ER stress markers

ER stress and the unfolded protein response (UPR) are critically involved in the initiation of many diseases, such as the metabolic syndrome (Kaufman, 2002 ; Thomas *et al.*, 2010 ; Zhang, C. *et al.*, 2012). In addition, this pathway has been

reported to play an important role in LD formation and lipogenesis promotion in the liver (Fei, Shui, *et al.*, 2011 ; Lee, J. S. *et al.*, 2012). To determine if Seipin deficiency could induce ER stress, we measured the mRNA levels of key genes implicated in this process. In *BSCL2* siRNA-transfected HepG2 cells, *ATF4* and *GRP78* mRNA expression was increased by a little over 50% and *CHOP* by 100% (**Figure.3.7A**). PERK protein levels were also increased by 34% and 27% in *BSCL2/Bscl2* siRNA-transfected HepG2 cells as well as primary rat hepatocytes, respectively (**Figure.3.7B**). Our study revealed that Seipin deficiency induces expression of several markers of ER stress.

### 3.6 Discussion

#### 3.6.1 ER-based regulation of lipid synthesis and storage within LDs

In this study, we first confirmed that *Bscl2* is expressed in mouse liver (**Figure.3.1A**) albeit at a low protein level relative to testis, as previously reported for mRNA (Chen, W. *et al.*, 2009). One group was recently able to detect the Seipin protein in human liver using LC/MS (humanproteomemap.org; (Kim, M. S. *et al.*, 2014). We used siRNA to lower Seipin protein levels in hepatocytes (**Figure.3.1B**). This induced an increase in the number and the size of LDs (**Figure.3.2A**, **Supplementary Figure.3.9**). We also observed LD aggregation defects (**Figure.3.2B**), implying that Seipin plays a role in the generation, expansion and morphology of LDs. These observed changes in shape and number of LDs are similar to reported results in yeast, where a depletion of the *BSCL2* yeast ortholog *SEI1/FLD1* led to LDs with irregular shapes and sizes (Fei *et al.*, 2008 ; Szymanski *et al.*, 2007 ; Wang, C. W., Miao et Chang, 2014 ; Wolinski *et al.*, 2015). Up to 30% of the *SEI1/FLD1* deletion mutants contained one or a few supersized LDs and about 60% of them contained an amorphous aggregation of LDs (Fei *et al.*, 2008).

Seipin has been suggested to act as a scaffold protein (Talukder *et al.*, 2015), however its function remains unclear. Seipin and SCD1 proteins are both localized in the ER (Lundin *et al.*, 2006 ; Ntambi *et al.*, 2002), and colocalize significantly in HepG2 cells (**Figure.3.5A**). Moreover, Seipin and SCD1 have opposite effects on LD homeostasis (**Figure.3.5B**). Taken together, our results suggest that Seipin and SCD1 are part of an ER-resident protein complex that controls LD formation. Different models for LD biogenesis consistently suggest that LDs emerge from the ER (Walther et Farese, 2009). The most accepted model posits that the accumulation of TAG between the bilayer leaflets of the ER membrane drives the genesis of nascent LDs (Brasaemle et Wolins, 2012 ; Harris *et al.*, 2011). In accordance with this, LDs have been localized in close proximity to or even tethered to the ER in yeast (Novikoff *et al.*, 1980 ; Perktold *et al.*, 2007).

Seipin deficiency in hepatocytes caused lipid accumulation and was associated with increased expression of *CHOP*, *GRP78*, *ATF4* and the protein PERK (**Figure.3.7**), four markers of the unfolded protein response (UPR) to ER stress. A similar consequence of Seipin deficiency was previously observed in neuronal cells (Ito, D. et Suzuki, 2009 ; Yagi *et al.*, 2011). In these prior studies, loss-of-function mutations in the Seipin protein induced a “seipinopathy”, a motor neuron disease associated with high LD formation and TAG storage as well as ER stress (Holtta-Vuori *et al.*, 2013). Interestingly, an activation of the UPR (PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4) pathway, like the one seen in our *in vitro* models (**Figure.3.7**), can activate the expression of several lipogenic genes (*Acc/ACC*, *Fas/FAS*, *Scd1/SCD1*) and the associated transcription factor SREBP-1c (Fang *et al.*, 2013 ; Gentile, Frye et Pagliassotti, 2011 ; Liu, L. *et al.*, 2014 ; Puri, P. *et al.*, 2008 ; Rinella *et al.*, 2011), thereby accentuating hepatic lipid synthesis/storage and potentially aggravating a nascent hepatic steatosis (Fang *et al.*, 2013 ; Gentile, Frye et Pagliassotti, 2011 ; Puri, P. *et al.*, 2008 ; Zhang, X. Q. *et al.*, 2014).

### 3.6.2 SCD1 activity and fatty acid metabolism

The presence of smaller than normal LDs in *C.elegans fat-6;fat-7* double mutants lacking most desaturases (Shi *et al.*, 2013) suggests SCD activity is required for LD expansion. The MUFA/SFA intracellular lipid ratio also seems to play an important role in LD homeostasis, most notably on fusion and growth (Arisawa *et al.*, 2013). This is consistent with a role for SCD1, an enzyme that converts SFAs into MUFAs, in LD biogenesis and, by extension, TAG storage. For example, an increase in LD size within 3T3-L1 preadipocyte cells is associated with an increase in SCD1 expression and MUFA/SFA ratio (Arisawa *et al.*, 2013). The increase in SCD1 expression (**Figure.3.4B**) following our *BSCL2* knockdown was concomitant with an increase in the MUFA/SFA ratio (hence SCD1 activity; **Figure.3.5E**) and TAG synthesis (**Figure.3.4A and 3.6E**).

Moreover, high *Scd1* expression activates *de novo* lipogenesis via an elevation in hepatic SREBP-1c levels (Miyazaki *et al.*, 2007) that consequently increases the expression of lipogenic genes, including *Scd1* itself. The potential therefore exists for a reinforcing feedback loop to be established, leading to *Scd1* overexpression and enhancing hepatic lipogenesis following a Seipin deficiency (**Figure.3.4**). Underlying the important role of SCD1 in TAG metabolism, DGATs (key enzymes implicated in TAG synthesis) colocalize with SCD1 in the ER (Man *et al.*, 2006) and could have synergistic interactions with Seipin (Tian *et al.*, 2011). The increase in number and size of LDs we observed following *BSCL2* knockdown (**Figure.3.5B**) could be due to lipid metabolism changes secondary to an increase in SCD1 activity. In agreement with this hypothesis, 3T3-L1 preadipocyte cells bearing a *Bscl2* mutation, and presumably possessing increased SCD1 activity, exhibit enhanced TAG synthesis (Fei, Li, *et al.*, 2011). Overall, increased SCD1 activity appears sufficient to explain most of the observed effects on fatty acid metabolism following *Bscl2/BSCL2*

knockdown, including elevated PPAR $\gamma$  signaling and CD36-mediated fatty acid uptake (He *et al.*, 2011) (**Figure.3.3**).

In accordance with this, a *SCD1* knockdown reversed the effect of a Seipin deficiency on LD formation (**Figure.3.5B**) and on lipid metabolism (**Figure.3.5C,D**) in hepatocytes.

### 3.6.3 Lipogenesis and insulin resistance

Though most of the research to date supports a critical role for Seipin in adipose tissue (Chen, W. *et al.*, 2012 ; Cui *et al.*, 2011 ; Gao *et al.*, 2015), we have shown that the Seipin protein is also expressed in hepatocytes and that, at least in cultured cells, it can play a role in LD biogenesis and hence TAG storage. *Bscl2/BSCL2* knockdown led to a decrease in LD formation in mature adipose cells, whereas an increase was observed in preadipocytes and human AML-12 hepatocytes (Yang, W. *et al.*, 2013), similar to what we obtained with our cultured hepatocytes (**Figure.3.2A**).

Several previous studies have clearly demonstrated that Seipin deficiency in both mice and humans leads to insulin resistance (Chen, W. *et al.*, 2012 ; Cui *et al.*, 2011 ; Prieur *et al.*, 2013). Surprisingly, we observed that Seipin deficiency increased hepatocyte insulin sensitivity, as reflected by elevated phosphorylation of AKT, ERK and pP70S6K proteins (**Figure.3.6A**). In agreement with our results, Chen and collaborators observed improved hepatic insulin signaling in *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice, as measured by insulin clamp (Chen, W. *et al.*, 2014). To explain their result, the authors suggest that the enhanced insulin sensitivity observed after 16h fasting stems from increased levels of insulin receptors and downstream signaling effectors such as IRS1 and AKT (Chen, W. *et al.*, 2014). The increased insulin sensitivity observed in our *BSCL2* siRNA-transfected hepatocytes may be explained, at least in part, by the effect that Seipin deficiency has on fatty acid uptake, *de novo* lipogenesis



(**Figure.3.4C,D**) and SCD1 activity (**Figure.3.5E**), as an increase in MUFA has been shown to stimulate insulin signalling (Coll *et al.*, 2008 ; Nardi *et al.*, 2014 ; Salvado *et al.*, 2013 ; Vessby *et al.*, 2001 ; Xiao *et al.*, 2006). Interestingly, the decrease in AMPK phosphorylation/activity we observed (**Figure.3.6B**) can lead to an activation of its targets, notably the lipogenic enzyme ACC (Zhou *et al.*, 2001). A combined increase in gluconeogenesis (**Figure.3.6C**) and insulin signaling can also lead to an activation of lipogenic markers such as FAS, SCD1 and ACC (**Figure.3.4**) (Decaux, Antoine et Kahn, 1989 ; Foufelle *et al.*, 1992 ; Jones *et al.*, 1998 ; Koo, Dutcher et Towle, 2001 ; O'Callaghan *et al.*, 2001 ; Prip-Buus *et al.*, 1995 ; Waters et Ntambi, 1994).

### 3.7 Conclusion

We showed that Seipin depletion in cultured hepatocytes leads to an increase in LD number and size. These changes in LD homeostasis are probably due to an upregulation of lipid metabolism, characterized by an increase in SCD1 activity leading to a higher MUFA/SFA ratio. In accordance with this, a *SCD1* knockdown reversed the LD formation defects and the changes in lipid metabolism homeostasis associated with Seipin depletion. Interestingly, Seipin and SCD1 also colocalize, leading us to propose a functional interaction within the ER membrane whereby Seipin controls lipid metabolism and storage through SCD1 activity and LD formation.

### 3.8 Acknowledgments

We wish to thank Dr. Jocelyne Magre (University of Nantes, France) for kindly providing us with mRNA and protein extracts from *Bscl2*<sup>-/-</sup> mice, as well as Dr.

Xiaoqin Ye (University of Georgia, USA) for samples of *Bscl2*<sup>-/-</sup> mouse liver. We also thank Denis Flipo for his precious help with confocal microscopy, the laboratory of Dr. Diana Averill for primary rat hepatocytes and Dr. Daniel Boismenu for his help with data analysis and discussion. The Discovery Grants Program of the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) funded this research. MAL and SL were supported by the Fond de Recherche du Québec-Nature et Technologie (FRQNT) fellowships.

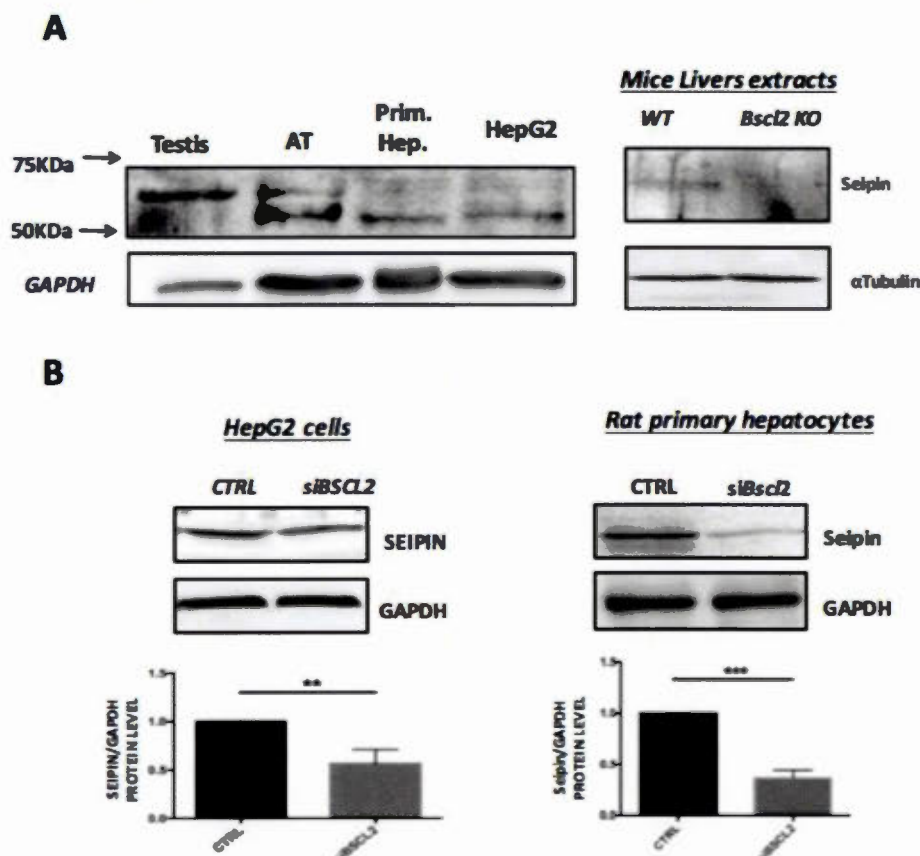
### **3.9 Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

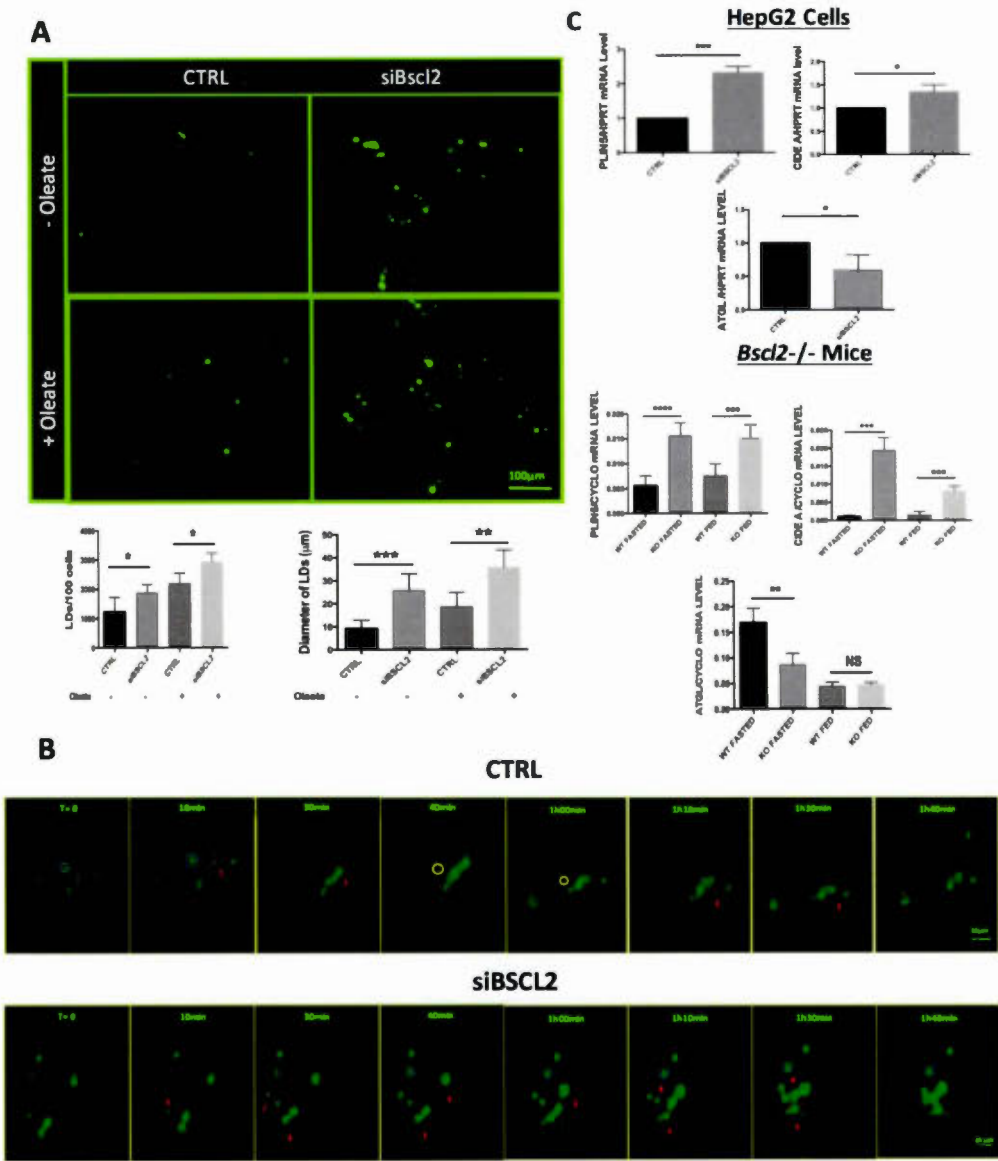
### **3.10 Author contributions**

MAL and CM designed the study. MAL performed and analyzed most experiments. SL performed and analyzed the experiments shown in Figures 4C, 5A and 6B. SAR performed and analyzed the experiments shown in Figure 6A. JCR and DMM performed and analyzed the experiments shown in Figure 5D. MAL, KFB and CM analyzed the experiments and wrote the paper. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

## 3.11 Figures

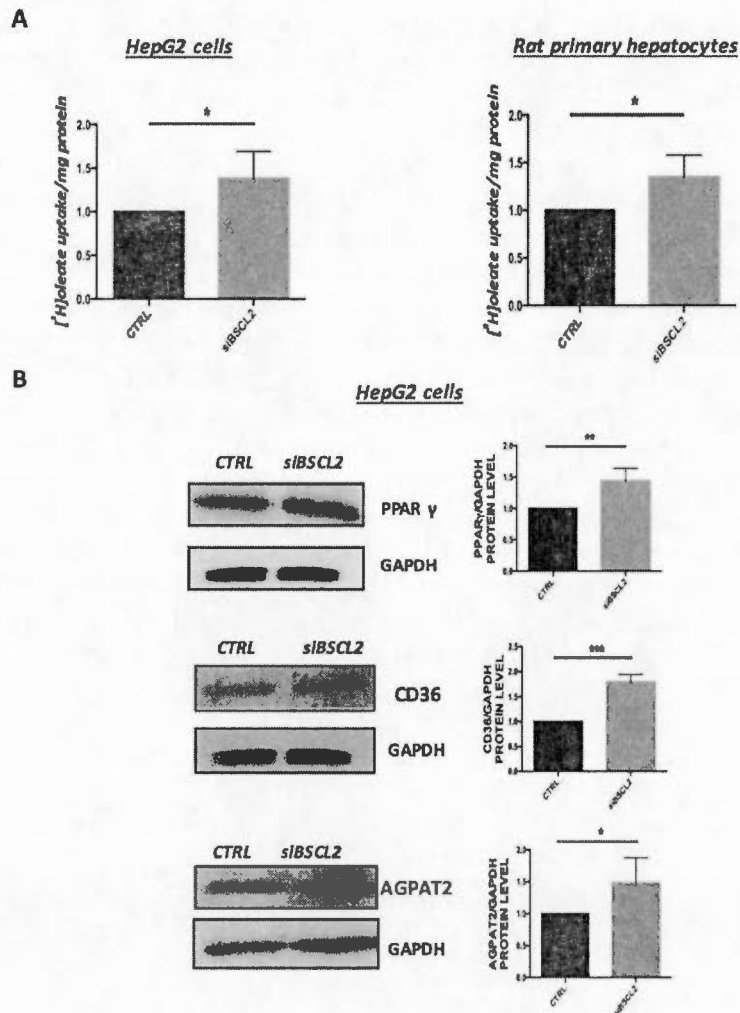


**Figure 3.1. Seipin expression in hepatocytes.** (A) Seipin expression was evaluated by Western blot in protein extracts prepared from rat testis, rat adipose tissue (AT), primary rat hepatocytes and HepG2 cells (*left panels*), as well as liver of WT and *Bsc12*<sup>-/-</sup> mice (*right panels*). GAPDH was used as a loading control. (B) Seipin expression was evaluated by Western blot in HepG2 cells (*left panels*) and rat primary hepatocytes (*right panels*) transfected with a *Bsc12* siRNA (siBSCL2) or a scrambled control (CTRL). Protein levels evaluated by densitometry were normalized against GAPDH and presented relative to scrambled control. Graphs represent quantification of 5 independent experiments. \*\*  $p < 0.002$ . \*\*\*  $p < 0.001$ .

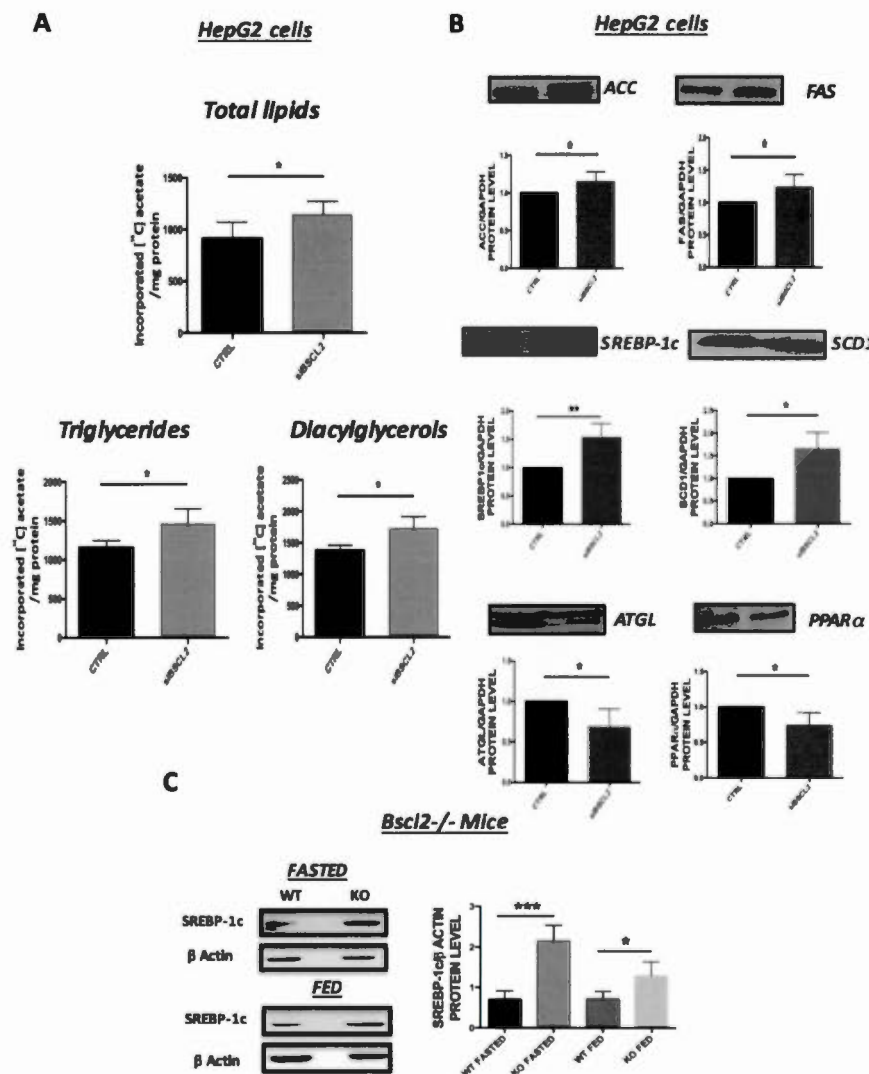


**Figure 3.2. Seipin deficiency in hepatocytes affects LD formation, expansion and fusion.** (A) Rat primary hepatocytes and HepG2 cells were transfected with scrambled (CTRL) or *Bscl2* siRNA (siBSCL2), and treated (or not) with 50  $\mu$ M oleate for 24h. Cells were stained with Bodipy 493/503 to allow quantification of LD number and size. Bar: 100  $\mu$ m. Graphs represent quantification of 5 independent experiments. Results are expressed for number and size of LD as number of LDs per 100 cells and diameter of LDs ( $\mu$ m), respectively. (B) Time-lapse analysis of LD formation in control and Seipin-deficient HepG2 cells. Cells were transfected with scrambled (CTRL) or *BSCL2* siRNA (siBSCL2), incubated with 50  $\mu$ M oleate and Bodipy 493/502 and imaged by confocal microscopy in a 37°C chamber supplied with 5% CO<sub>2</sub>. Images were taken every 10min over a period of 16.5h. T=0 in figures corresponds to hour 14 of the time-lapse. Outlined in blue: LD expansion/persistence, red: LD fusion, yellow: LD degradation. Bar: 35  $\mu$ m. (C) Expression of genes involved in LD formation and stabilization were evaluated by qRT-PCR in siRNA-transfected HepG2 cells, and in the liver of wild-type (WT) and *Bscl2*<sup>-/-</sup> (KO) mice fasted for 24h or fed *ad libitum*. Graphs represent quantifications of 5 independent experiments. Results were normalized against HPRT1 or *Ppia/CyclophilinA* (CYCLO) and are presented relative to scrambled control where appropriate. \* p<0.05. \*\* p<0.002. \*\*\* p<0.001. \*\*\*\* p<0.0001. NS: not significant.

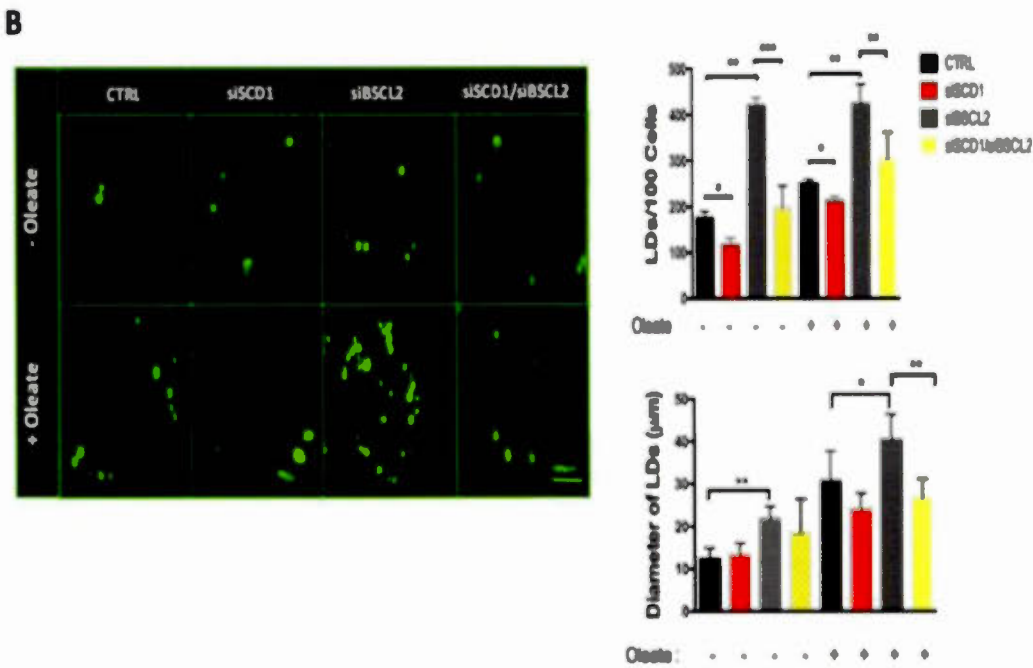
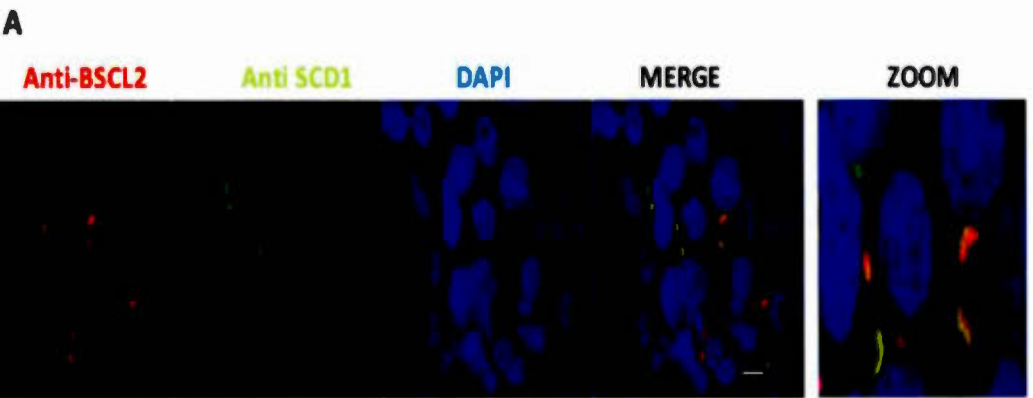


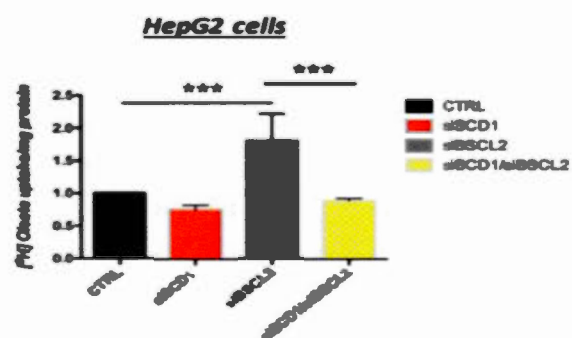
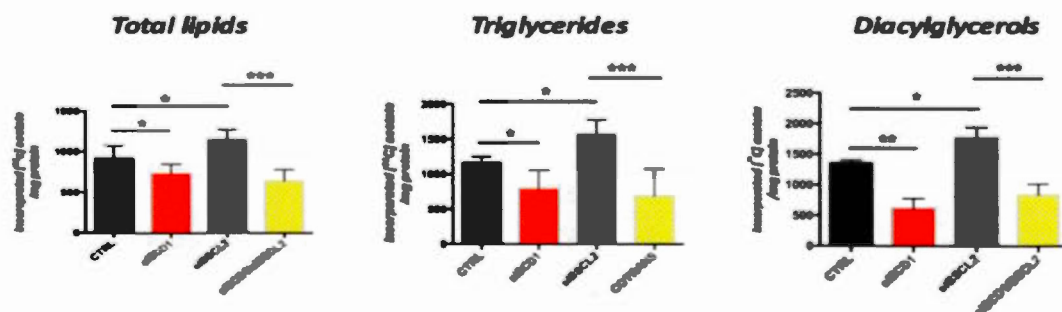
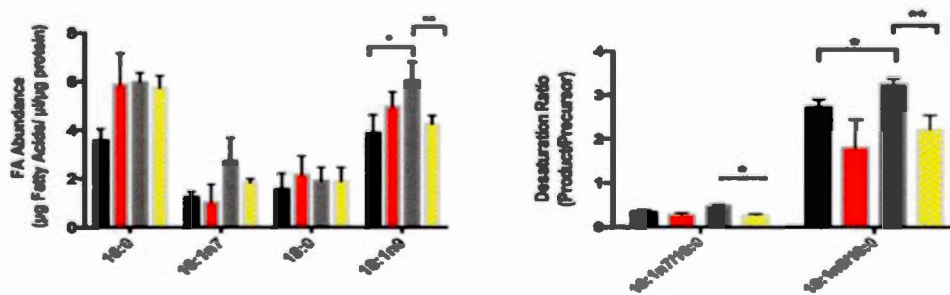


**Figure 3.3. Seipin deficiency increases fatty acid uptake in hepatocytes.** (A) HepG2 cells and rat primary hepatocytes were transfected with scrambled (CTRL) or *BSCL2* siRNA (siBSCL2) and incubated with [<sup>3</sup>H]oleate for 10min. Incorporated radioactivity was measured in cell lysates and expressed as CPM/mg of total protein. (B) HepG2 cells were transfected with scrambled (CTRL) or *BSCL2* siRNA (siBSCL2), and Western blot analyses were performed to measure the expression of proteins involved in fatty acid uptake (PPAR $\gamma$  and CD36). The expression level of AGPAT2, implicated in the PPAR $\gamma$  signaling pathway, is also presented. Protein levels evaluated by densitometry were normalized against GAPDH and presented relative to scrambled control. Graphs represent quantification of 5 independent experiments. \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.002$ . \*\*\*  $p < 0.001$ .



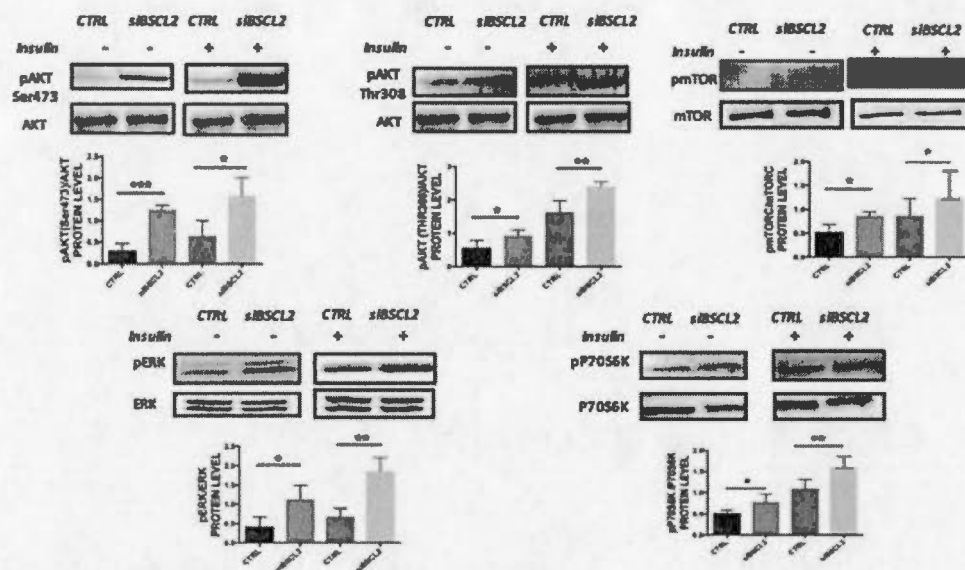
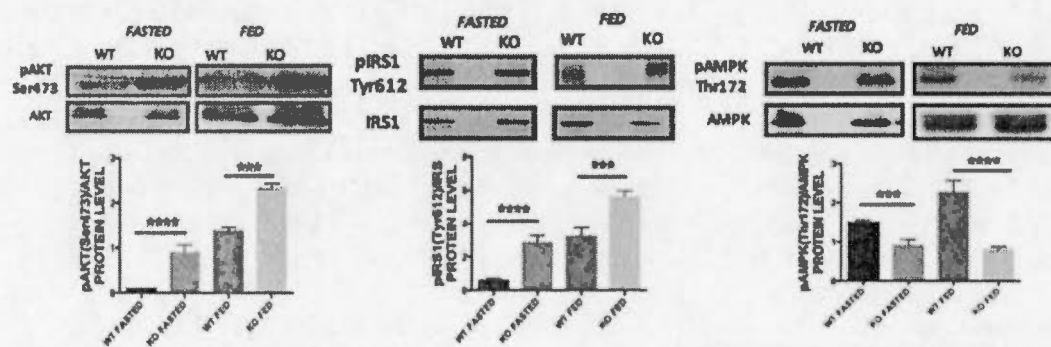
**Figure 3.4. Seipin deficiency increases *de novo* lipogenesis in hepatocytes.** (A) HepG2 cells were transfected with scrambled (CTRL) or *BSCL2* siRNA (siBSCL2) and incubated with [<sup>14</sup>C]acetate for 4h. Incorporated radioactivity was measured in extracted total lipids, triglycerides and diacylglycerol, and expressed as CPM/mg of total protein. The expression of proteins involved in lipid metabolism (ACC, FAS, SREBP-1c, SCD1, ATGL and PPARα) was measured by Western blot in siRNA-transfected HepG2 cells (B), as well as in the liver of wild-type (WT) and *Bscl2*<sup>-/-</sup> (KO) mice fasted for 24h or fed *ad libitum* (C). Protein levels evaluated by densitometry were normalized against GAPDH or β-Actin and presented relative to scrambled control where appropriate. Graphs represent quantification of 5 independent experiments. \* p<0.05. \*\* p<0.002. \*\*\* p<0.001.

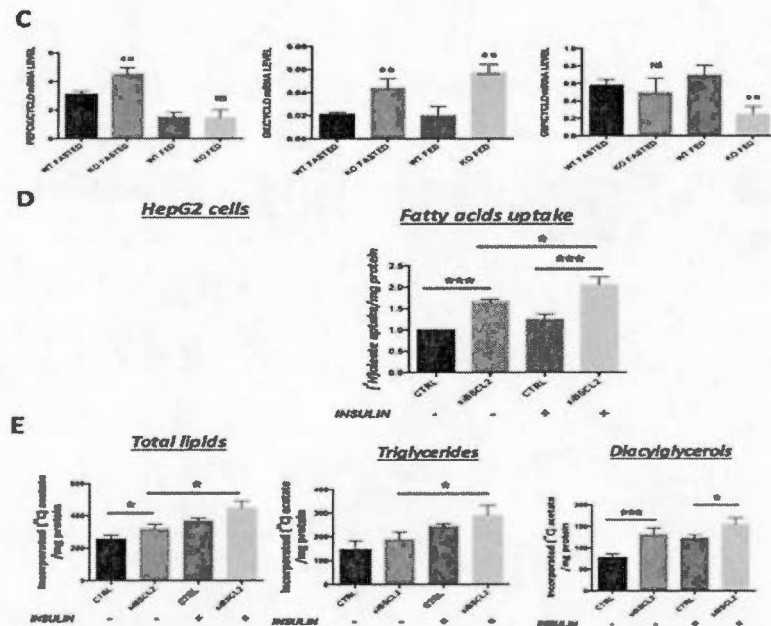


**C****D****HepG2 cells****E****HepG2 cells**

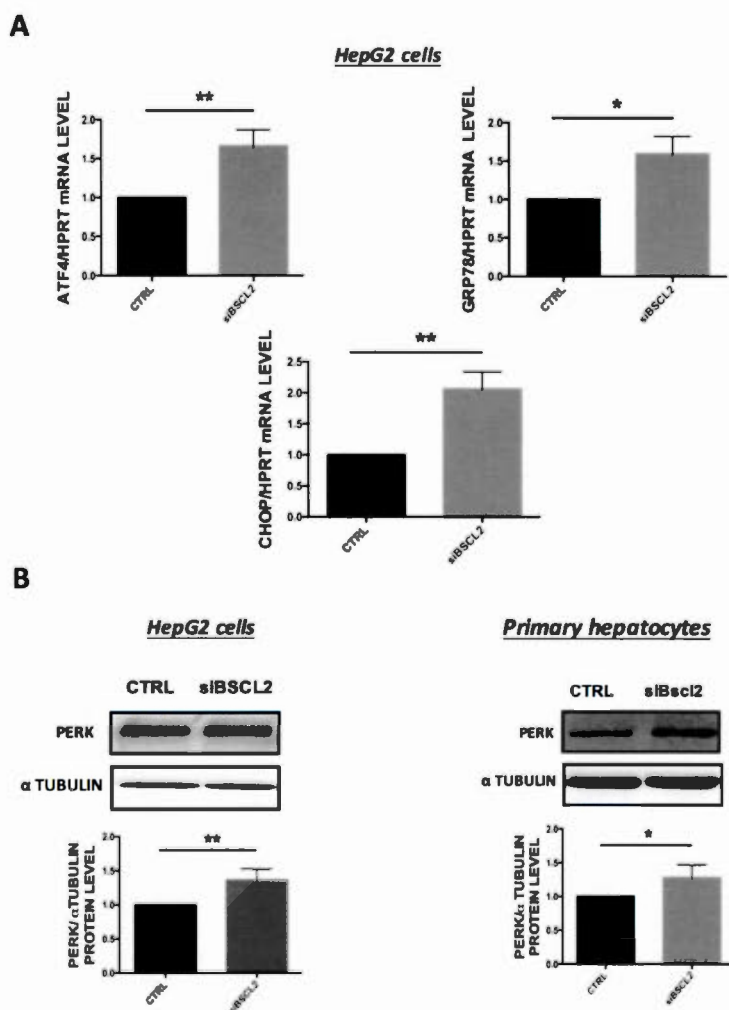
**Figure 3.5. SCD1 knockdown reverses the phenotype observed in Seipin-deficient hepatocytes.** (A) Confocal images of HepG2 cells showing dual staining for Seipin (red) and SCD1 (green). Merged image shows sites of colocalization (yellow). (B) HepG2 cells were transfected with scrambled (CTRL), *SCD1*, *BSCL2*, or cotransfected with both *SCD1* and *BSCL2* siRNAs. Cells were then treated (or not) with 50 $\mu$ M oleate for 24h. Cells were stained with Bodipy 493/503 to allow quantification of LD number and size. Bar: 100 $\mu$ m. Graphs represent quantification of 5 independent experiments. Results are expressed for number and size of LD as number of LD per 100 cells and diameter of LD ( $\mu$ m), respectively. (C) HepG2 cells were transfected with scrambled (CTRL), *SCD1*, *BSCL2*, or with both *SCD1* and *BSCL2* siRNA(s). Cells were incubated with [ $^3$ H]oleate for 10min. Incorporated radioactivity was measured in cell lysates and expressed as CPM/mg of total protein. (D) HepG2 cells were transfected with scrambled (CTRL), *SCD1*, *BSCL2*, or with both *SCD1* and *BSCL2* siRNA(s). Cells were incubated with [ $^{14}$ C]acetate for 4h. Incorporated radioactivity was measured in extracted total lipids, triglycerides and diacylglycerol, and expressed as CPM/mg of total protein. (E) The total SFA (16:0 and 18:0) and MUFA (16:1n7 and 18:1n9) cellular content of HepG2 cells transfected with scrambled (CTRL), *SCD1*, *BSCL2* or cotransfected with both *SCD1* and *BSCL2* siRNAs was determined by gas chromatography. The results of 4 experiments are presented as mean  $\pm$  SEM and compared to CTRL for statistical analyses. \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.002$ . \*\*\*  $p < 0.001$ .



**A*****HepG2 cells*****B*****Bscl2<sup>-/-</sup> Mice***

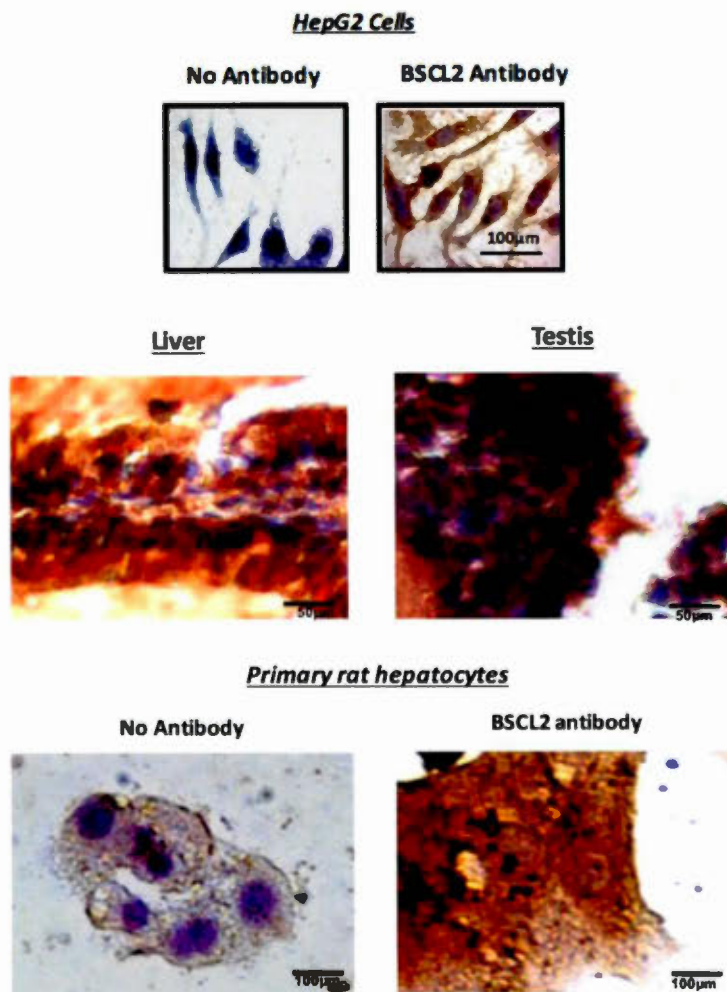


**Figure 3.6. Seipin deficiency in hepatocytes promotes insulin sensitivity.** (A) HepG2 cells were transfected with scrambled (CTRL) or *BSCL2* siRNA (siBSCL2) and incubated with 100nM insulin for 10min. AKT, ERK, mTOR and P70S6K protein expression as well as their phosphorylation states were evaluated by Western blot. (B) AKT, IRS1 and AMPK protein expression levels and phosphorylation states were evaluated in the liver of wild-type (WT) and *Bscl2*<sup>-/-</sup> (KO) mice fasted for 24h or fed *ad libitum*. Graphs represent quantification of 5 independent experiments. (C) Expression levels of genes involved in gluconeogenesis (*Pepck*, *Gk* and *G6p*) were measured in the liver of wild-type (WT) and *Bscl2*<sup>-/-</sup> (KO) mice fasted for 24h or fed *ad libitum*. Results were normalized to *Ppia/CyclophilinA* (CYCLO) levels. Graphs represent quantification of 3 independent experiments. KO results were compared to WT for statistical analyses. \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.002$ . \*\*\*  $p < 0.001$ . \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . NS: not significant. (D) HepG2 cells were transfected with scrambled (CTRL) or *BSCL2* siRNA (siBSCL2). Cells were then incubated with [<sup>3</sup>H]oleate for 10min in the presence or absence of 100nM insulin. Incorporated radioactivity was measured in cell lysates and expressed as CPM/mg of total protein. (E) HepG2 cells were transfected with scrambled (CTRL) or *BSCL2* siRNA (siBSCL2) and incubated with [<sup>14</sup>C]acetate for 4h in the presence or absence of 100nM insulin. Incorporated radioactivity was measured in extracted total lipids, triglycerides and diacylglycerol, and expressed as CPM/mg of cellular protein. Graphs represent results of 5 independent experiments and data is presented relative to non-stimulated scramble control.

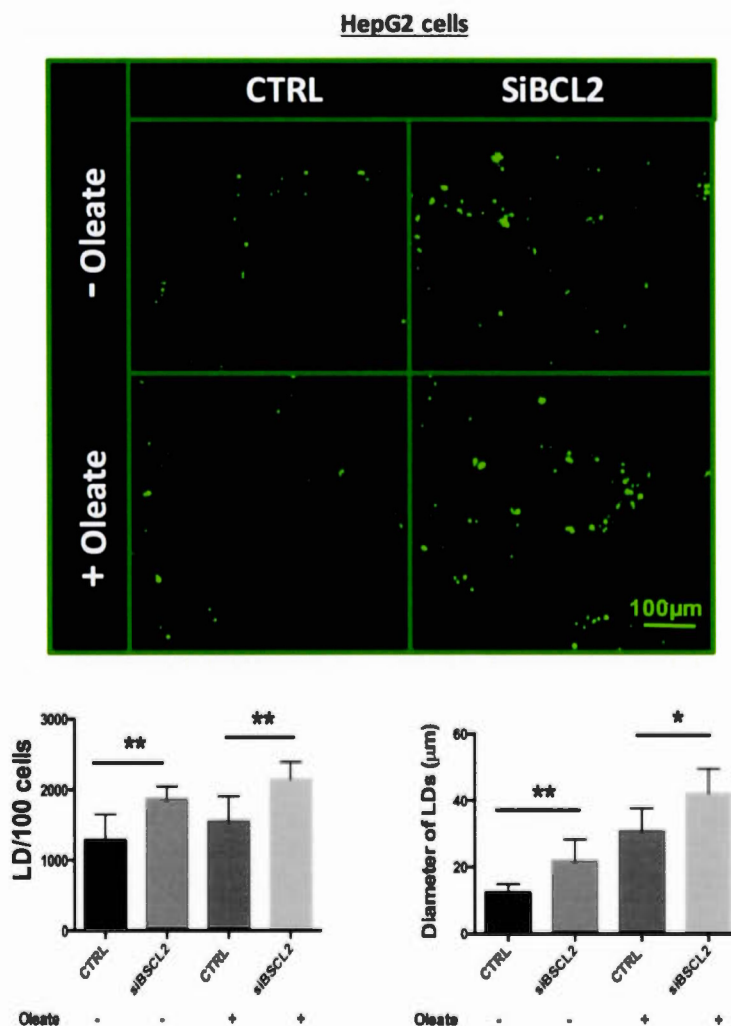


**Figure 3.7. Seipin deficiency in hepatocytes increases the expression of ER stress markers.** (A) The expression of genes involved in ER stress (*ATF4*, *GRP78* and *CHOP*) was measured by qRT-PCR in HepG2 cells transfected with scrambled (CTRL) or *BSCl2* siRNA (siBSCl2). Graphs represent quantification of 5 independent experiments and data is presented relative to scrambled control. (B) PERK expression was measured by Western blot in HepG2 cells and primary rat hepatocytes transfected with scrambled (CTRL) or *BSCl2/Bsc12* siRNA (siBSCl2). Protein levels evaluated by densitometry were normalized against  $\alpha$ -TUBULIN and presented relative to scrambled control. Graphs represent quantification of 5 independent experiments. \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.002$ .

### 3.12 Supplementary Figures

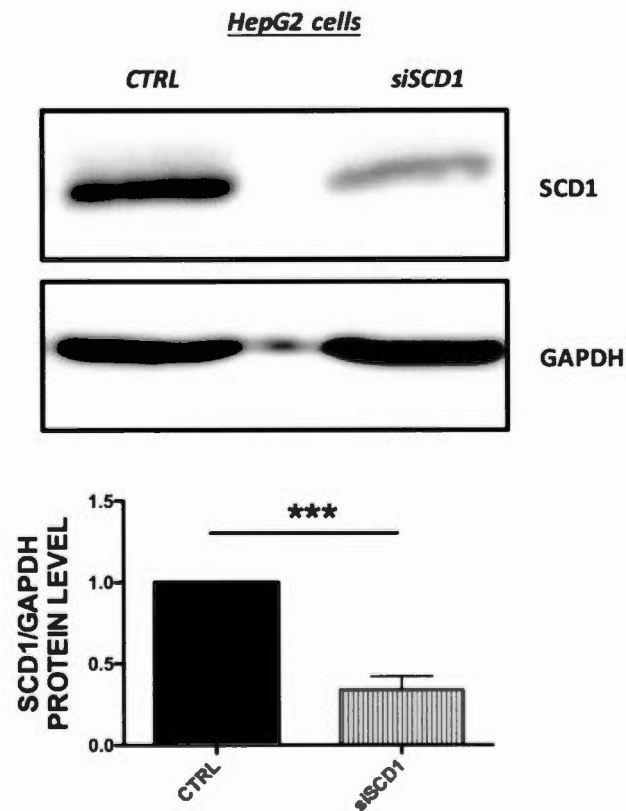


**Figure 3.8. Supplementary Figure S1. Detection of Seipin by immunohistochemistry in various tissues.** Rat testis and liver were collected, 4% paraformaldehyde-fixed 24h, dehydrated and embedded in paraffin wax. Tissue sections (5µm) were mounted on polylysine-coated slides and Immunohistochemical staining (brown color) was performed using an anti-Seipin antibody and was followed by nucleus counterstaining (blue) with Hematoxylin. HepG2 cells and primary rat hepatocytes were 4% paraformaldehyde-fixed 30 min and stained using the same protocol. A negative control without primary antibody is presented for comparison. Bar: 100µm.



**Figure 3.9. Supplementary Figure S2. BSCL2 deficiency in HepG2 cells affects lipid droplet formation.** HepG2 cells were transfected with scramble (CTRL) or *BSCL2* siRNA. Cells were then incubated 24h (or not) with 50µM oleate. LDs were stained with Bodipy 493/503. Cells were then visualized by confocal microscopy. The number and the average size of LDs were quantified using the *Image J* software. Graphs represent quantification of 5 independent experiments and results are presented relative to scramble control. \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.002$ .





**Figure 3.10. Supplementary Figure S3. SCD1 expression in HepG2 cells.** SCD1 expression in protein extracts prepared from HepG2 cells transfected with a *SCD1* siRNA (siSCD1) or a scrambled control (CTRL) were evaluated by Western blot. Protein levels evaluated by densitometry were normalized against GAPDH and presented relative to scrambled control. Graphs represent quantification of 5 independent experiments. \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Tableau 3.1. List of antibodies used for immunoblotting.**

<b>Antibody target</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Catalog number</b>	<b>Concentration used</b>
ACC	Cell Signaling Tech.	3662	1: 1000
AGPAT2	Abcam	ab62599	1: 500
AKT	Cell Signaling Tech.	9272	1: 1000
AMPK $\alpha$	Cell Signaling Tech.	2532	1: 1000
ATGL	Cayman Chemical	10006409	1: 1000
BSCL2/Seipin	Santa Cruz Biotech.	sc-55987	1: 200
CD36	Abcam	ab78054	1: 1000
ERK1/2	Cell Signaling Tech.	9103	1: 1000
FAS	Santa Cruz Biotech.	sc-55580	1: 1000
GAPDH	Cell Signaling Tech.	5174	1: 1000
goat IgG (HRP-linked)	Santa Cruz Biotech.	sc-2020	1: 1000
IRS1	Cell Signaling Tech.	2382	1: 1000
mouse IgG (HRP-linked)	Cell Signaling Tech.	7076	1: 1000
p-AKT (Thr 308)	Cell Signaling Tech.		1: 1000

Antibody target	Manufacturer	Catalog number	Concentration used
p-AKT (Ser 473)	Cell Signaling Tech.	4060	1: 1000
p-AMPK $\alpha$ (Thr 172)	Cell Signaling Tech.	2535	1: 1000
p-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204)	Cell Signaling Tech.	4370	1: 1000
p-IRS1 (Tyr 612)	Santa Cruz Biotech.	sc-17195-R	1: 1000
p-P70S6K (Thr389)	Cell Signaling Tech.	9234	1: 1000
P70S6K	Cell Signaling Tech.	9202	1: 1000
PERK	Cell Signaling Tech.	3192	1: 1000
PPAR $\alpha$	Santa Cruz Biotech.	sc-9000	1: 1000
PPAR $\gamma$	Cell Signaling Tech.	2435	1: 1000
rabbit IgG (HRP-linked)	Cell Signaling Tech.	7074	1: 1000
SCD1	Abcam	ab19862	1: 1000
SREBP-1c	Santa Cruz Biotech.	sc-366	1: 1000
$\beta$ -ACTIN	Cell Signaling Tech.	4970	1: 1000

## **CHAPITRE IV**

### **SCD1 DEFICIENCY PROTECTS MICE AGAINST ETHANOL INDUCED LIVER INJURY**

Lounis MA<sup>1,2</sup>, Escoula Q<sup>1,2</sup>, Veillette C<sup>1</sup>, Bergeron KF<sup>1,2</sup> and Mounier C<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departement des Sciences Biologiques, UQAM, Montreal, Quebec, Canada

<sup>2</sup>Centre de recherche Biomed, UQAM, Montreal, Quebec, Canada

**Accepté à BBA-Molecular and Cellular Biology of Lipids**

**Biochim Biophys Acta. 2016 Jul 28;1861(11):1662-1670.**

**Juillet 2016**

**Avant-propos**

L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'effet de la déficience en SCD1 dans le développement et la progression de la stéatose hépatique alcoolique (AFLD). En effet, des études antérieures ont montré que les souris SCD1 déficientes sont résistantes à l'installation d'une stéatose hépatique non alcoolique induite par une diète obésogène. Cependant, il n'existe pas d'étude montrant l'effet de l'inhibition de SCD1 dans le développement de l'AFLD.

Pour cela nous avons utilisé un protocole combinant une administration chronique de 5% d'éthanol pendant 10 jours suivie d'un gavage avec 5 g/kg d'éthanol à des souris SCD1 déficientes et des souris sauvages. Nous avons aussi utilisé des souris HepG2 traitées avec de l'éthanol pendant 24h suivi d'une incubation avec un inhibiteur de SCD1 afin de voir si l'inhibition de SCD1 pourrait constituer une thérapie pour l'AFLD.

Le projet a été développé par moi-même et j'ai participé à la totalité des expériences et à la rédaction du manuscrit. Quentin Escoula m'a aidé dans les expériences sur les souris et l'élaboration des figures 4.2-4.4. Cathy Veillette et moi-même avons participé aux expériences *in vitro* ayant permis à l'élaboration de la figure 4.7. J'ai participé avec les Dr C Mounier et Dr KF Bergeron à l'élaboration des figures, l'analyse des résultats et la rédaction du manuscrit.



#### 4.1 Résumé

La stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1) est une enzyme qui catalyse la synthèse des AGMI en désaturant les acides gras saturés en position delta-9. Elle jouerait ainsi un rôle important dans la régulation de la lipogenèse *de novo* et la  $\beta$ -oxydation dans le foie. Des études antérieures ont montré que des souris SCD1 déficientes sont résistantes à l'installation d'une stéatose hépatique non alcoolique induite par une diète obésogène. Le but de notre étude est de caractériser l'effet de la déficience en SCD1 dans le développement et la progression d'une stéatose hépatique alcoolique. Nous avons utilisé un protocole d'administration chronique de 5% éthanol dans une diète liquide pendant 10 jours suivis d'un gavage à 5 g/kg/ d'éthanol à des souris SCD1 déficientes. Nous avons aussi traité avec de l'éthanol des cellules HepG2. Notre étude montre dans un premier temps que l'utilisation d'une diète faible en gras et spécifiquement en AGMI avec ce modèle d'administration chronique d'alcool suivi d'un gavage d'éthanol induit un dommage du foie et une inflammation associée. Dans deuxième temps, nous avons montré que les souris SCD1 déficientes sont résistantes au développement d'une stéatose alcoolique et d'une inflammation associée. En effet, ces souris montrent une diminution de l'accumulation des gouttelettes lipidiques, de la lipogenèse *de novo* et des cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de la  $\beta$ -oxydation comparé aux souris sauvages nourries avec le même protocole. Nous avons confirmé ces résultats dans des cellules HepG2 traitées avec un inhibiteur de SCD1.

Nous résultats montrent que la déficience en SCD1 protège contre l'installation d'une AFLD et pourrait constituer une thérapie potentielle pour les patients atteints de cette maladie.

**Mots Clés:** Stéatose alcoolique (AFLD), SCD1, Lipogenèse *de novo*, Inflammation.

## 4.2 Abstract

Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) is a delta-9 fatty acid desaturase that catalyzes the synthesis of mono-unsaturated fatty acids (MUFA). SCD1 is a critical control point regulating hepatic lipid synthesis and  $\beta$ -oxidation. SCD1 KO mice are resistant to the development of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Using a chronic-binge protocol of ethanol-mediated liver injury, we aim to determine if these KO mice are also resistant to the development of alcoholic fatty liver disease (AFLD).

Feeding mice on a low-fat diet (especially low in MUFA) containing 5% ethanol for 10 days, followed by a single ethanol (5g/kg) gavage, developed severe liver injury manifesting as hepatic steatosis. This was associated with an increase in *de novo* lipogenesis and inflammation. Using this model, we show that SCD1 KO mice are resistant to the development of AFLD. SCD1 KO mice do not show accumulation of hepatic triglycerides, activation of *de novo* lipogenesis nor elevation of cytokines or other pro-inflammatory markers. Incubating HepG2 cells with a SCD1 inhibitor induced a similar resistance to the effect of ethanol, confirming a role for SCD1 activity in mediating ethanol-induced hepatic injury.

Taken together, our study shows that SCD1 is a key player in the development of AFLD and associated deleterious effects, and suggests SCD1 inhibition as a therapeutic option for the treatment of this hepatic disease.

**Keywords:** Alcoholic fatty liver disease, SCD1, *de novo* lipogenesis, inflammatio

### 4.3 Introduction

Alcohol consumption and abuse is a risk factor of chronic disease worldwide and has long been identified as a major risk factor for all liver diseases (Ki *et al.*, 2010). Liver diseases induced by ethanol abuse ranges from simple fatty liver to more severe forms of liver injury such as alcoholic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Lucey, Mathurin et Morgan, 2009 ; O'Shea *et al.*, 2010). A fatty liver, also known as alcoholic fatty liver disease (AFLD), is the earliest sign of ethanol-induced liver injury. This fat accumulation (i.e., steatosis) is usually accompanied by inflammation (Liu, J., 2014). AFLD occurs in 80% of heavy drinkers who consume an excess of 80g of ethanol per day (Levene et Goldin, 2012). This state is usually asymptomatic and can be reversed after 4 to 6 weeks of abstinence (Mendenhall, 1968). However, continued heavy ethanol consumption increases by 30% the risk of progression to cirrhosis (Teli, Day, *et al.*, 1995). Unfortunately, 5-15% of patients with AFLD develop fibrosis and cirrhosis despite abstinence (Sorensen *et al.*, 1984). In most heavy ethanol consumers, hepatic steatosis is caused by a decrease in fatty acid oxidation, an increase in fatty acid uptake and an activation of *de novo* lipid synthesis (DNL) (Eagon, 2010).

Approximately 90% of ingested ethanol is metabolized in the liver (Liu, J., 2014). Alcohol is first oxidized to acetaldehyde by alcohol dehydrogenase (ADH) and partly metabolized by cytochrome P-450 and catalase in hepatocyte microsomes and peroxisomes, respectively (Liu, J., 2014). Acetaldehyde is the major toxin in ethanol-induced liver injury, causing cellular damage, inflammation and fibrosis (Stickel et Hampe, 2012). Acetaldehyde also increases the redox ratio of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH/NAD<sup>+</sup>) leading to a reduction of fatty acid  $\beta$ -oxidation through a direct reduction of PPAR- $\alpha$  (Israel *et al.*, 1977 ; Liu, J., 2014). You and collaborators have shown that ethanol induces fatty acid synthesis by activation of the sterol regulatory element-binding protein (SREBP) (You *et al.*, 2002). Notably,

SREBP-1 plays a central role in lipid metabolism by regulating the transcription of genes involved in hepatic lipid synthesis such as SREBP itself, ACC, FAS, and SCD1 (Fearnside et Loskutoff, 1997 ; You *et al.*, 2002). Acetaldehyde is then converted to acetate by acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) in mitochondria of hepatocytes (Mello *et al.*, 2008). In AFLD, the high hepatic levels of acetate in hepatocytes, the main substrate of ACC, lead to the formation of acetyl-CoA through the activation of DNL via SREBP (Yamashita, Kaneyuki et Tagawa, 2001). In addition to lipid accumulation, the production of TNF- $\alpha$  is one of the earliest responses to ethanol-induced liver injury (Tilg et Diehl, 2000). TNF- $\alpha$ , a mediator of the mammalian inflammatory response, up-regulates hepatic SREBP mRNA expression, activates its maturation and reduces PPAR $\alpha$  expression (Liu, J., 2014). Taken together, all these modifications lead to the aggravation of liver injury (Liu, J., 2014).

SCD1 is a delta-9 fatty acid desaturase that catalyzes the synthesis of 16:1(n-7) and 18:1(n-9) mono-unsaturated fatty acids (MUFA). SCD1 is a key enzyme in the regulation of hepatic lipogenesis and  $\beta$ -oxidation of lipids (Cohen, P. *et al.*, 2002). Increases in the hepatic desaturation index resulting from elevated SCD1 expression and activity have been associated with non-alcoholic fatty liver (NAFLD) and metabolic syndrome (Bjermo et Riserus, 2010). Several studies have shown that SCD1-deficient mice are protected against obesity and NAFLD (MacDonald *et al.*, 2008 ; Ntambi *et al.*, 2002). SCD1-KO mice have reduced lipid synthesis and enhanced  $\beta$ -oxidation of lipids, as well as increased thermogenesis and insulin sensitivity in various tissues, including the liver. These metabolic changes protect the SCD1-KO mice from a variety of dietary, pharmacological, and genetic conditions that promote hepatic steatosis.

As previously mentioned in the pathogenesis of alcoholic liver disease, previous studies described an increase in *de novo* lipogenesis characterized by an increase in the expression of key genes implicated in lipid metabolism (You *et al.*, 2002). Due to

its central role in hepatic lipid metabolism and its implication in the development of NAFLD (Liu, J., 2014), we evaluated the role of SCD1 in the development of AFLD. We show that SCD1 KO mice are completely protected against AFLD, suggesting that decreasing SCD1 activity can offer a new therapeutic strategy for the treatment of this disease.

#### **4.4 Materials and Methods**

##### **4.4.1 Mice**

Wild-type (WT) C57BL/6N mice were purchased from Charles River laboratories (Senneville, Canada). SCD1 knockout (SCD1 KO) mice in the C57BL/6N background were generated in our animal facilities. The SCD1 KO line was a generous gift of Dr J.M. Ntambi (U. Wisconsin, Madison, USA). Only male mice were used in the study. The Animal Care and Use Committee of the Université of Québec in Montréal (UQÀM) approved all animal experimental protocols.

##### **4.4.2 Chronic + binge protocol of alcoholic fatty liver disease induction**

Twelve week-old male WT and SCD1 KO mice were acclimated to a low-fat liquid control diet (AIN-76 (F1268); Bio-Serv, Frenchtown, USA) for 5 days. Thereafter, the animals were divided in three groups: WT with control diet (CTRL) (n=8), WT with ethanol diet (EtOH) (n=8) and SCD1 KO with ethanol diet (SCD1 KO EtOH) (n=8). The ethanol groups (EtOH and SCD1 KO EtOH) were fed a liquid diet (AIN-76 (F1436); Bio-Serv, Frenchtown, USA) containing 5% ethanol for 10 days while the CTRL group was maintained on the control diet. At day 11, mice in EtOH groups were gavaged a single dose of EtOH (5g/kg body weight, 31,5% solution), whereas



mice in the control group were gavaged an isocaloric dose of dextrin maltose (45% solution). The gavage was always performed in the early morning. After gavage, mice were kept on control or EtOH diet for an additional 9h. During this time, the animals were kept on a warm electric blanket. After gavage, mice were slow moving, but conscious and regained normal behavior within 4-6h. The mice were euthanized 9h after gavage, when ALT and AST serum levels reach their peak (Bertola *et al.*, 2013).

#### **4.4.3 Plasma transaminase assays**

Blood was collected from mice by cardiac exsanguination in collection tubes containing 10 IU/ml Heparin. The blood was then centrifuged for 10min at 200g and the serum was collected for subsequent analysis. Serum aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) activities were measured using a Beckman DxC automated Monarch device (Biochemical laboratory, Notre-Dame Hospital, Montréal, Canada).

#### **4.4.4 Liver histology**

To detect fat deposition in the liver, frozen samples of livers from both CTRL and EtOH groups were embedded in Optimal Cutting Temperature compound (OCT) (Fisher Scientific, Hampton, USA), sectioned (4-8 $\mu$ m) using a cryostat (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) and fixed for 10min in 4% paraformaldehyde. Then sections were stained with Oil Red-O (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) for lipid accumulation and nuclei were lightly stained with Hematoxylin. Hematoxylin and Eosin (H&E) staining was used to evaluate neutrophil infiltration (Ki *et al.*, 2010). Images were acquired with an A1 Nikon microscope using a 20X objective lens and a color camera.

#### **4.4.5 Immunofluorescence**

Immunofluorescence was used to evaluate the expression of F4/80, a macrophage marker. We used 8µm sections of livers from different groups as described above. Sections were then permeabilized for 10min using PBS 1X containing 0,25% Triton-X100 (PBST), blocked for 30min in 1% Bovine serum albumin (BSA) in PBST and finally incubated with Alexa Fluor 647 F4/80 antibody (1:250) (BioLegend, London, UK). Nuclei were then stained with DAPI and images were acquired with an A1 Nikon confocal microscope using a 20X objective lens.

#### **4.4.6 Triglyceride assay**

Concentration of liver triglycerides was determined using a colorimetric assay kit from Cayman Chemical (Ann Arbor, USA). Briefly, 200mg of liver tissue was homogenized in 1ml of Standard Diluent containing cOmplete protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). The homogenate was then centrifuged at 4°C for 10min at 10,000g. The supernatant was collected and hepatic triglycerides were measured by enzymatic hydrolysis of triglycerides to glycerol and free fatty acids, followed by colorimetric measurement (at 540nm wavelength) of glycerol. Values for hepatic triglycerides were expressed as mg of triglyceride per g of liver tissue.

#### **4.4.7 HepG2 cell culture**

HepG2, a human hepatoma cell line, was obtained from ATCC (Manassas, USA) and maintained in Eagles minimum essential medium (EMEM; Wisent, St-Jean-Baptiste, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Grand

Island, USA). Ethanol-induced injury was achieved by adding EtOH (100mM) to the medium for 24h followed an additional 24h in the presence of 1 $\mu$ M SCD1 inhibitor A939572 (Biofine, Vancouver, Canada) where appropriate.

#### 4.4.8 Lipid droplet imaging

Control and ethanol-treated HepG2 cells were washed three times with ice-cold 1X PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 30min. Lipid droplets (LDs) were stained for 10min with 1 $\mu$ g/ml Bodipy 493/503 (Life Technologies, Grand Island, USA). Fluorescence was visualized using a Nikon A1 confocal microscope using a 40X objective lens.

#### 4.4.9 Real-time PCR analysis

Total RNA was isolated from mice liver and HepG2 cells using the Trizol reagent (Fisher Scientific, Hampton, USA) and according to the manufacturer's protocol. One  $\mu$ g of total RNA was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) at 42°C for 1h using dT<sub>18</sub> oligonucleotide and SuperScript II reverse transcriptase according to the manufacturer's protocol (Life Technologies, Grand Island, USA). Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using a PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Life Technologies, Grand Island, USA) to quantify the mRNA levels of genes implicated in *de novo* lipogenesis and inflammation. Sequences of the primers used are listed in (Table 1). The PCR amplification reactions were performed in a Roche LightCycler 480 Instrument (Penzberg, Germany). Data were normalized using the housekeeping gene HPRT1 and expressed as fold changes relative to control samples using the comparative delta-Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) method.

#### 4.4.10 Western blot analysis

Cold PBS-washed liver tissues and HepG2 cells were homogenized in RIPA buffer containing 0.1mM PMSF and 1% of cOmplete protease inhibitor (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). The homogenates were then centrifuged at 15,000g 15min at 4 °C, and the supernatant collected. The protein concentrations were determined using a protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Proteins were separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). The membranes were blocked with 5% non-fat skim milk and incubated with either an anti-NF- $\kappa$ B (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), an anti-SREBP-1c (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), an anti-CPT1 (1:1000; Abcam, Cambridge, USA) or an anti-PPAR $\alpha$  (1:1000; Cell Signaling, Danvers, USA) antibody. After incubation, the membranes were washed in 1X PBS + 0.1% Tween and incubated with anti-mouse or anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5000; Cell Signaling Technology, Danvers, USA). The immunoreactive bands were revealed by chemiluminescence (Millipore, Billerica, USA) and using a chemi-luminometer (FusionFX, Collegien, France).

#### 4.4.11 Statistical Analysis

Data are expressed as means  $\pm$ SD. To compare values between two groups, the Student t test was performed. To compare values between three or more groups, a one-way ANOVA test was performed followed by a Tukey's post hoc test. Comparison tests with  $p$ -values  $< 0.05$  were considered significantly different.

## 4.5 Results

### 4.5.1 Chronic + binge ethanol feeding leads to AFLD

In the present study, we used a low-fat (5%) liquid diet. This diet contains a lower amount of MUFA (3,7g/L) compared to other commercially available liquid diets. Using this diet in a chronic + binge protocol of ethanol (EtOH) abuse, leads to mice with severe liver injury characterized by changes consistency and color. The livers of the EtOH group appear pale, yellow and granular compared to controls (**Figure.4.1A**), and there is a significant increase in the gallbladder content of the EtOH group (*data not shown*). There is also an important hepatic fat accumulation (**Figure.4.1B**), high AST (440 *versus* 97 IU/L for controls) and ALT (120 *versus* 31 IU/L for controls) serum levels, as well as a 3.2-fold increase in hepatic triglycerides (TG) (**Figure.4.1C**). Interestingly, neutrophil infiltrations are specifically observed in the liver sections of the EtOH group (**Figure.4.1D**).

We observed a continuous decrease in body weight during EtOH consumption (**Figure.4.2A**). This is confirmed by a similar decrease in final body weight (**Figure.4.2B**) and is probably the result of a decrease in food intake in the EtOH group (**Figure.4.2C**). Altogether, these features demonstrate the induction of AFLD by ethanol feeding.

### 4.5.2 SCD1 deficiency protects mice against AFLD

To characterize the role of SCD1 in the development of AFLD, we used this chronic + binge ethanol feeding protocol on SCD1 KO mice. As for WT mice, the body weight of SCD1 KO mice steadily decreases on the EtOH diet (**Figure.4.2**). As previously mentioned, livers of the EtOH group (WT mice) show significant changes in colour and aspect (**Figure.4.3A; middle panel**). Interestingly, livers of the SCD1 KO mice



fed with EtOH appear normal (**Figure.4.3A; right panel**) and very similar to the livers of the control group (**Figure.4.3A; left panel**). As expected, a large number of Red O-stained lipid droplets are seen in the livers of WT mice fed with EtOH (**Figure.4.3B; middle panel**) while little staining is visible in the livers of SCD1 KO EtOH mice (**Figure.4.3B; right panel**). Hematoxylin and Eosin staining reveals neutrophil infiltrations in the liver of WT mice fed with EtOH (**Figure.4.3C; right panel, red arrows**) while no significant neutrophil infiltration can be detected in the SCD1 KO EtOH mice (**Figure.4.3C; right panel**) nor in the control group (**Figure.4.3C; left panel**). Neutrophil infiltrations in EtOH-injured livers are associated with an increased number of F4/80<sup>+</sup> macrophages (**Figure.4.3D**).

AST and ALT serum levels (**Figure.4.4A,B**) are very low in SCD1 KO mice compared to WT mice fed with EtOH (160 and 65 IU/L *versus* 443 and 141 IU/L for AST and ALT, respectively). Hepatic triglyceride levels (**Figure.4.4C**) and the hepatic index (HI) (**Figure.4.4D**) are also very low in the SCD1 KO EtOH group compared to EtOH only (32mg/dL and 2.55% *versus* 136mg/dL and 3.90%), and are actually similar to control values (42mg/dL for TG content and 2.62% for HI).

#### 4.5.3 Effect of ethanol feeding on hepatic lipogenesis and $\beta$ -oxidation

As lipid parameters are dramatically increased in the livers of EtOH-fed WT mice (**Figure.4.3B; 4.4C,D**), we measured the relative mRNA expression of key genes involved in *de novo* lipogenesis (DNL) such as SREBP-1c, ACC, FAS, LXR $\alpha$  and SCD1. As an increase in TG content may also results from a decrease in  $\beta$ -oxidation, the level of expression of key genes involved in this process were also examined (PPAR $\alpha$  and CPT1). Our results show that compared to control, EtOH feeding of WT mice leads to a significant increase in the expression of genes implicated in DNL (**Figure.4.5A**), while genes implicated in  $\beta$ -oxidation are decreased (**Figure.4.5B**). Remarkably, in EtOH-fed SCD1 KO mouse livers, no such increase of lipogenic gene expression is observed (**Figure.4.5A**). We also observe a significant increase in the

expression of genes involved in the  $\beta$ -oxidation pathway in SCD1 KO mouse livers (Figure.4.5B).

#### **4.5.4 SCD1 deficiency protects mice against ethanol-induced inflammation**

As the livers of EtOH-fed WT mice show several indications of inflammation (Figure.4.1D; 4.3C,D), we measured the relative mRNA expression of key genes involved in this process. An elevation of gene expression is seen for a number of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , INF $\gamma$  and IL-6) (Figure.4.6A), as well as for some monocyte (MCP and CCR2; Figure.4.6B) and macrophage (F4/80; Figure.4.6C) markers, in the livers of WT mice fed with EtOH compared to the control group. Remarkably, SCD1 KO mice fed with EtOH do not show upregulation of these inflammatory markers, except for a modest increase of INF $\gamma$  relative to control (Figure.4.6A).

#### **4.5.5 SCD1 inhibition protects HepG2 cells against ethanol-induced injury**

In order to confirm that our observations in SCD1 KO mouse livers are associated with a decrease in SCD1 activity, and to explore the therapeutic potential of SCD1 inhibition, we treated HepG2 cells exposed to EtOH with an inhibitor of SCD1 activity. We show that a SCD1 inhibitor (1  $\mu$ M A939572) considerably reduces lipid droplet accumulation in HepG2 cells pretreated for 24h with 50mM EtOH compared to cells treated with EtOH alone (Figure.4.7A). SREBP-1c mRNA and protein expression are elevated in EtOH-treated HepG2 cells. In the presence of a SCD1 inhibitor, SREBP-1c expression is lower than the one observed in EtOH-treated cells (Fig.4.7B), suggesting a prevention of DNL activation. PPAR $\alpha$  and CPT1 protein levels in HepG2 cells are diminished by EtOH-treatment. In presence of the SCD1

inhibitor, the expression of PPAR $\alpha$  and CPT1 remains elevated, suggesting high fatty acid oxidation (Fig.4.7B). Finally, the expression of inflammation markers TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B in HepG2 is increased following EtOH treatment, yet remains similar to control levels when SCD1 activity is inhibited (Fig.4.7C).

## 4.6 Discussion

In this study, we show that a murine liver injury characterized by significant steatosis and inflammation can be induced by an ethanol feeding protocol on a low-fat diet with very low MUFA content. Using this protocol, we demonstrate that SCD1 KO mice are resistant to the development of ethanol-induced liver steatosis and inflammation. We also show that treatment with a SCD1 activity inhibitor can considerably reduce ethanol-induced damages in HepG2 cell cultures. These findings clearly demonstrate a central role for SCD1 in the development of AFLD and identify SCD1 as a potential therapeutic target for treatment of this disease.

Recently, Gao and collaborators developed a new chronic + binge ethanol feeding protocol for mice (Bertola *et al.*, 2013) that is highly relevant to AFLD as it mimics chronic human alcohol consumption combined with occasional binge drinking. This protocol generates a more severe liver injury, with increased lipid accumulation and inflammation as well as higher AST and ALT serum levels, than other frequently used protocols. We used the same chronic + binge approach combined with a low-fat diet to induce liver injury in C57BL/6N mice (**Figure.4.1**). This low-fat (5.4%) AIN-76 diet contains very little MUFA (3.4g/L). Many studies, including those of Gao *et al.*, use the Lieber-De Carli 82 diet which contains 18% fat and 23.5g/L MUFA. As C16:1(n-7) and C18:1(n-9) MUFA are products of SCD1-mediated desaturation, it was important to limit the exogenous dietary contribution of these fatty acids in order to compensate for the lost of SCD1 activity in KO mice.

SCD1 KO mice are protected against ethanol-induced fatty liver injury (**Figure.4.3-6**). Livers of SCD1 KO ethanol-fed mice show a normal appearance (**Figure.4.3A,4.4D**), very low lipid accumulation (**Figure.4.3B,4.4C**) and no significant neutrophil or monocyte/macrophage infiltration (**Figure.4.3C,D**). However, we detect some hepatic injury via blood markers (AST and ALT; **Figure.4.4A,B**). The levels of hepatic fat accumulation in ethanol-fed SCD1 KO mice are similar to no-alcohol controls, and are probably the result of the low expression of genes involved in lipogenesis (SREBP-1, ACC, FAS, LXR $\alpha$  and SCD1; **Figure.4.5A**) (Strable et Ntambi, 2010). Ethanol treatment inhibits AMPK activity and lowers phosphorylation of ACC. Since these phosphorylation events are inhibiting, ACC activity is increased and DNL is induced in the presence of ethanol (You *et al.*, 2004). However, when SCD1 is inhibited, AMPK activity is increased, resulting in inhibition of ACC activity and DNL (Kim, E. *et al.*, 2011). SCD1 deficiency also inhibits SREBP-1 expression and maturation, leading to a further decrease in DNL (Miyazaki, Dobrzyn, Man, *et al.*, 2004). The importance of SCD1 activity in DNL regulation may therefore explain the absence of hepatic steatosis observed in the ethanol-fed SCD1 KO mice. These KO mice also show a significant increase in  $\beta$ -oxidation gene expression (PPAR $\alpha$  and CPT1), even compared to no-alcohol controls (**Figure.4.5B**). This increased hepatic lipid catabolism following SCD1 deficiency (Kim, E. *et al.*, 2011 ; Miyazaki *et al.*, 2007) could also explain the absence of steatosis in ethanol-fed SCD1 KO mice. In fact, an increase in  $\beta$ -oxidation can be sufficient to prevent fat deposition in liver (Miyazaki, Dobrzyn, Man, *et al.*, 2004).

SCD1 KO mice display a lower inflammation state than WT controls, as measured by adipocyte secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) (Liu, X. *et al.*, 2010). Treatment of macrophages from SCD1 KO mice with C18:1(n-9) MUFA induces an increase in TNF- $\alpha$  and promotes inflammation (Liu, X. *et al.*, 2010). However, the molecular mechanism by which SCD1 regulates inflammation remains

to be elucidated. Ethanol feeding of WT mice strongly induces the hepatic expression of cytokines (TNF- $\alpha$ , INF $\gamma$  and IL-6) (**Figure.4.6A**) as well as macrophage and monocyte markers (**Figure.4.6B,C**). In SCD1 KO mice, the levels of these inflammation markers remain similar to the ones measured in no-alcohol controls, with the exception of INF $\gamma$  (**Figure.4.6A**). The lack of neutrophil/macrophage infiltration (**Figure.4.3C,D**) and of monocyte/macrophage marker induction (**Figure.4.6B,C**) suggests an absence of hepatic inflammation in ethanol-fed SCD1 KO mice. This absence of inflammation could contribute to the effect of SCD1 deficiency on DNL and/or  $\beta$ -oxidation as TNF- $\alpha$  can induce SREBP-1c maturation and inhibit PPAR $\alpha$  expression, leading to an upregulation of DNL and a decrease in  $\beta$ -oxidation (Koszegi, 1991 ; Tai *et al.*, 2003).

To confirm that the ethanol-induced liver injury protection observed in SCD1 KO mice is a consequence of a deficiency in SCD1 activity, we exposed ethanol-treated HepG2 cells to a SCD1 inhibitor. In adipocytes, this SCD1 inhibitor decreases DNL and inflammation, and increases fatty acid oxidation (Liu, X., Strable et Ntambi, 2011), features we observe in livers of SCD1 KO mice. Interestingly, inhibition of SCD1 activity diminishes ethanol-induced lipid droplet accumulation (**Figure.4.7A**), DNL (SREBP-1c; **Figure.4.7B**) and inflammation (**Figure.4.7C**), and rescues ethanol-induced fatty acid  $\beta$ -oxidation (CPT1 and PPAR $\alpha$ ; **Figure.4.7B**). It appears that all the major aspects of ethanol injury we quantified in mice (hepatic steatosis, lipid anabolism/catabolism, inflammation) are repeated in this *in vitro* model and are normalized by an inhibition of SCD1 activity.

Ethanol consumption induces an increase in the concentration of acetyl-CoA in hepatic cells (Liu, J., 2014), leading to increased DNL and decreased fatty acid  $\beta$ -oxidation. This is also associated with increased inflammation, manifesting as elevated cytokine levels and neutrophil/macrophage infiltrations (**Figure.4.8A**). In contrast, in the absence of SCD1 expression or activity, these phenomena are almost



absent (**Figure.4.8B**). This might be the result of a higher SFA content, and increased SFA/MUFA ratio. Diets enriched in SFA are protective against EtOH induced liver injuries compared to diet enriched in unsaturated fatty acids (USF). Mice on a diet supplemented with saturated long chain fatty acids (palmitic acid (C16:0, 25%) and stearic acid (C18:0, 85%)) develop a less severe ethanol-associated liver disease (Kirpich *et al.*, 2016 ; Nanji, 2004 ; Ronis *et al.*, 2004).. These mice have reduced levels of hepatic injury, steatosis, and oxidative stress compared to ethanol-fed mice on a diet enriched in USF (oleic acid (C18:1, 27%) and linoleic acid (C18:2, 60%)) (Chen, P. *et al.*, 2015). The beneficial effect of a SFA-rich diet compared to an USF-rich diet, is attributed to the modulation of the hepatic Sirtuin- SREBP-1 - histone H3 axis, resulting in the suppression of lipogenic genes via a reduction of SREBP maturation (You *et al.*, 2008).

In conclusion, mice submitted to a chronic + binge ethanol feeding protocol on a low MUFA diet display liver injury and inflammation. Importantly, SCD1 deficiency almost completely prevents the deleterious effect of ethanol consumption in mice, highlighting the central role of SCD1 in AFLD. Future studies are needed to determine if a direct inhibition of SCD1 activity can help treat this disease.

#### 4.7 Acknowledgments

We wish to thank Dr. James M. Ntambi (University of Wisconsin-Madison, USA) for kindly providing us the SCD1 KO line. Dr. Pierre Olivier Héту (Notre, Dame Hospital, Université du Québec à Montréal, Canada) for the measurement of AST and ALT serum levels. We also thank the employees of our animal facility for their help (Université du Québec à Montréal, Canada). The Discovery Grants Program of the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) funded this

research. MAL is supported by a Fond de Recherche du Québec-Nature et Technologie (FRQNT) fellowship.

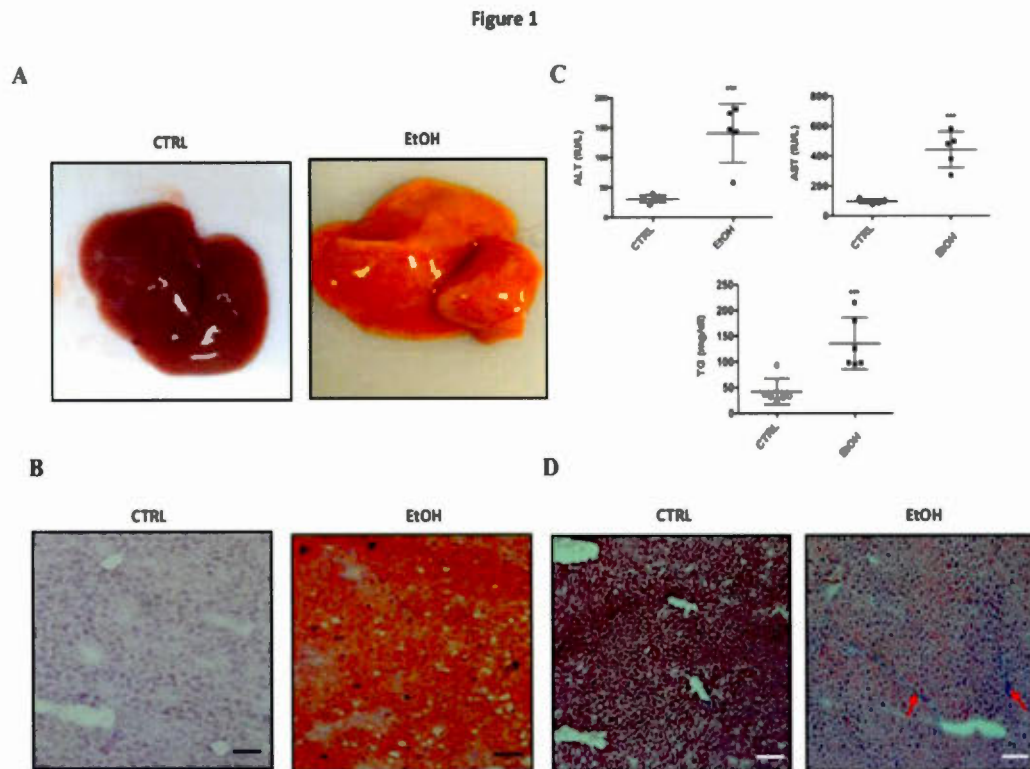
#### **4.8 Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

#### **4.9 Author contributions**

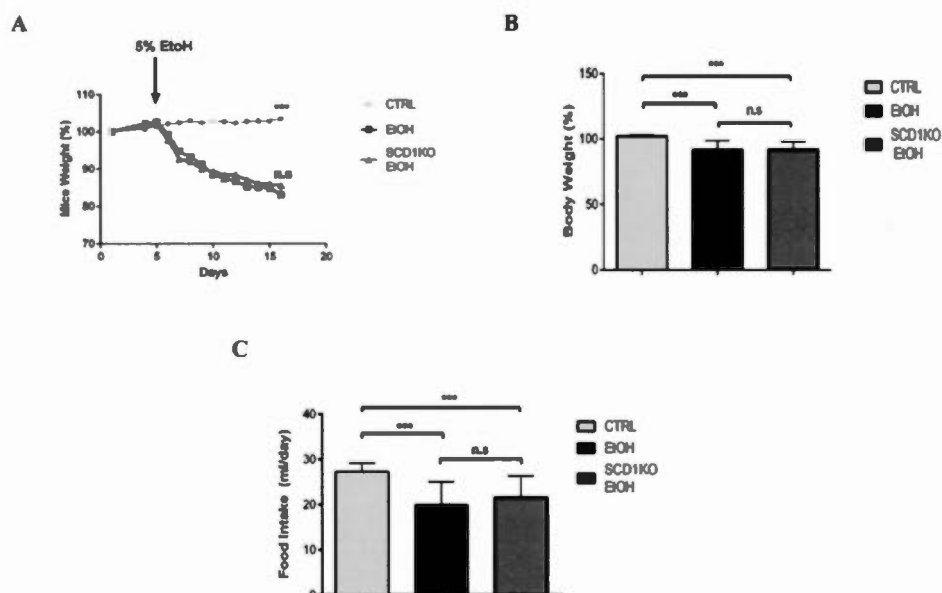
MAL and CM designed the study. MAL performed and analyzed most experiments. EQ performed and analyzed the experiments shown in Figures 2–4. CV performed the experiments shown in Figure 7. MAL, KFB and CM analyzed the experiments and wrote the paper. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

## 4.10 Figures

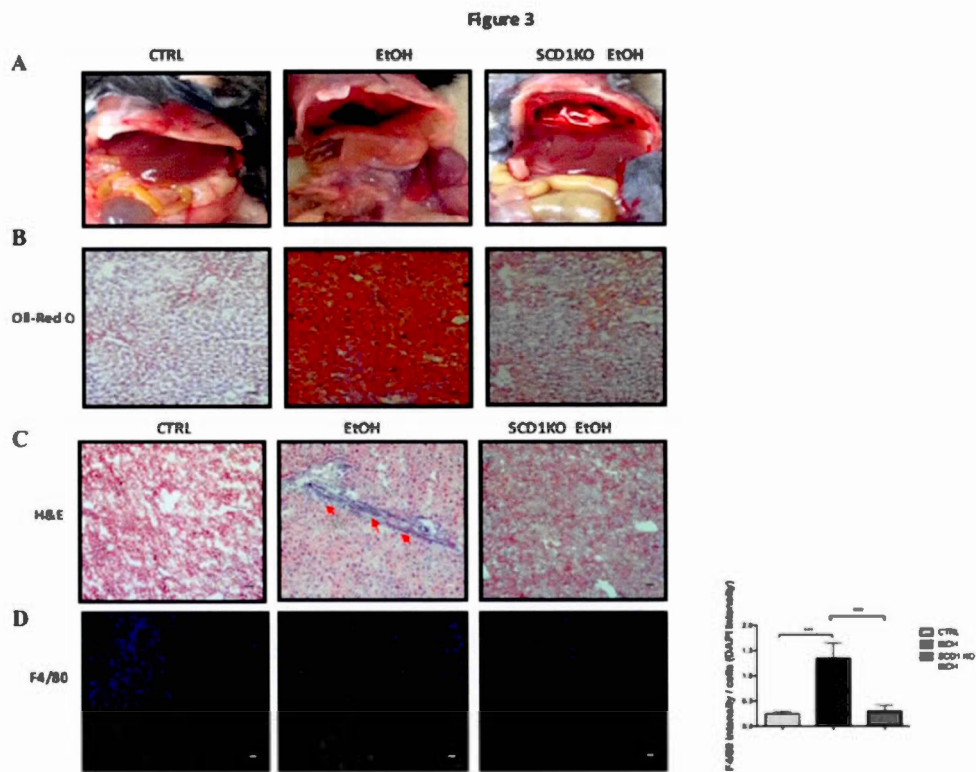


**Figure 4.1. Chronic + binge ethanol feeding induces a severe form of liver injury in mice.** Two groups of C57BL/6N mice were fed a liquid low-fat diet for 10 days. The diet of one group was supplemented with 5% ethanol (EtOH). At day 11, mice in the EtOH group were gavaged a single dose of ethanol (5g/kg body weight), whereas mice in the control group were gavaged an isocaloric dose of dextrin maltose. Mice were euthanized 9h after gavage. (A) Representative pictures of mice livers. (B) Oil Red-O and Hematoxylin staining of liver sections. (C) Concentration of serum AST and ALT, and TG? (D) Representative Hematoxylin and Eosin (H&E) staining of liver sections; red arrows show neutrophil infiltration. Scale bars: 10µm.

Figure 2

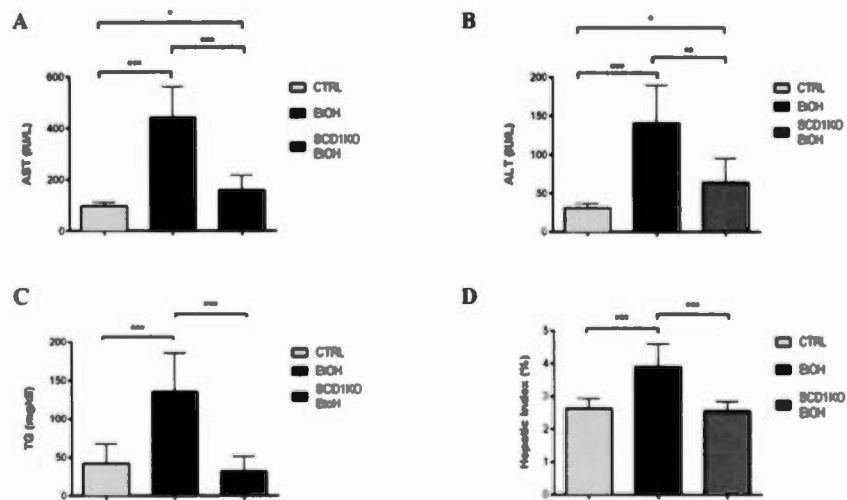


**Figure 4.2. Effect of ethanol feeding on body weight and food intake in WT and SCD1 KO mice.** After a 5 day acclimation period on the liquid diet, the chronic + binge protocol was used to induce AFLD. (A) Daily body weight. (B) Body weight on the last day of the protocol. (C) Average food intake (ml) per mouse per day. CTRL: control, EtOH: ethanol-fed, SCD1KO: SCD1 knockout. Values represent means  $\pm$  SD (n= 8). Student t-test: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  versus the corresponding control group. Scale bars: 10 $\mu$ m

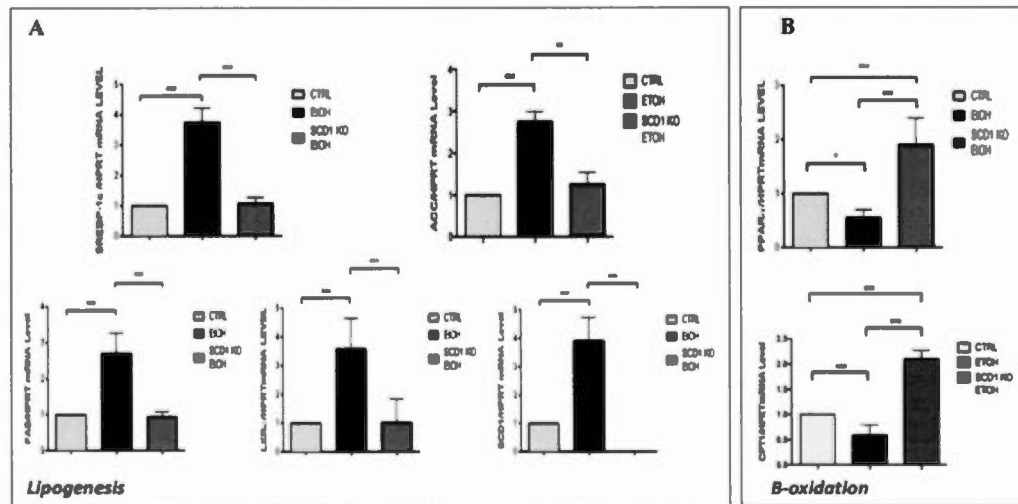


**Figure 4.3. Liver histology after ethanol feeding of WT and SCD1 KO mice.** (A) Representative pictures of mouse livers. (B) Hematoxylin and Oil Red-O staining of hepatic tissue sections. (C) Hematoxylin and Eosin (H&E) staining of liver sections; red arrows show neutrophil infiltration (D) Immunofluorescence staining of F4/80<sup>+</sup> cells (red) in liver sections. Cell nuclei are shown in blue.

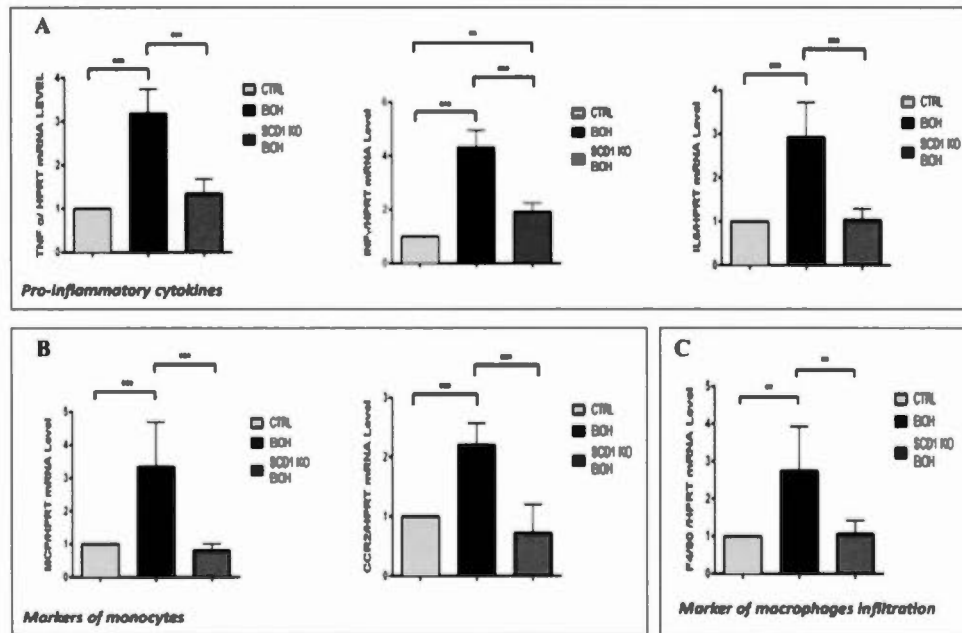




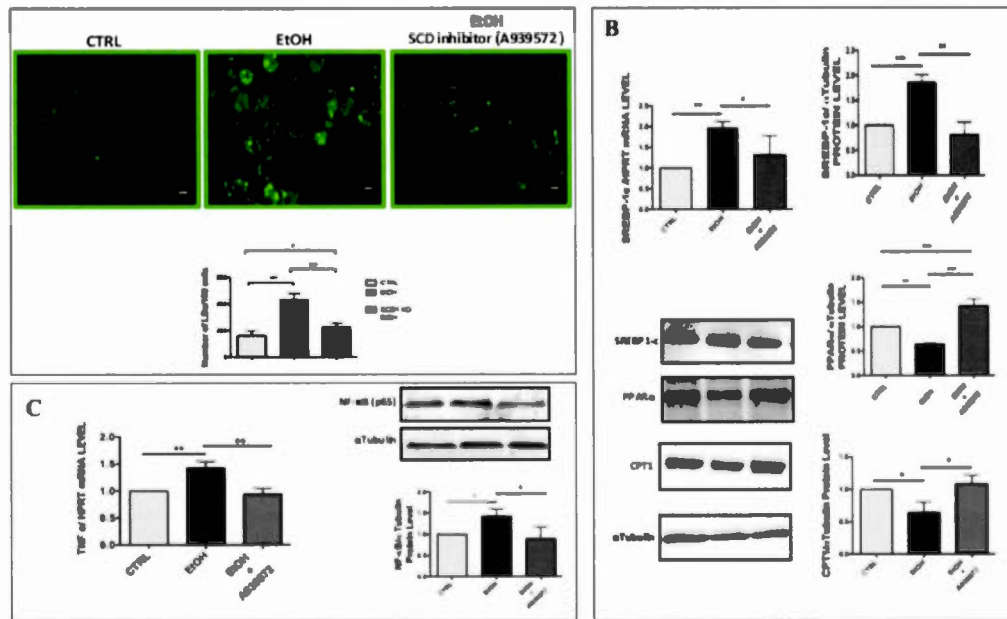
**Figure 4.4. Effect of ethanol feeding on hepatic metabolic characteristics of WT and SCD1 KO mice.** (A,B) Concentration of serum AST and ALT. (C) Hepatic triglyceride concentrations. (D) Hepatic index (%) calculated by dividing liver weight per body weight. Values represent means  $\pm$  SD (n= 8). Student t-test: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  versus the corresponding control group.



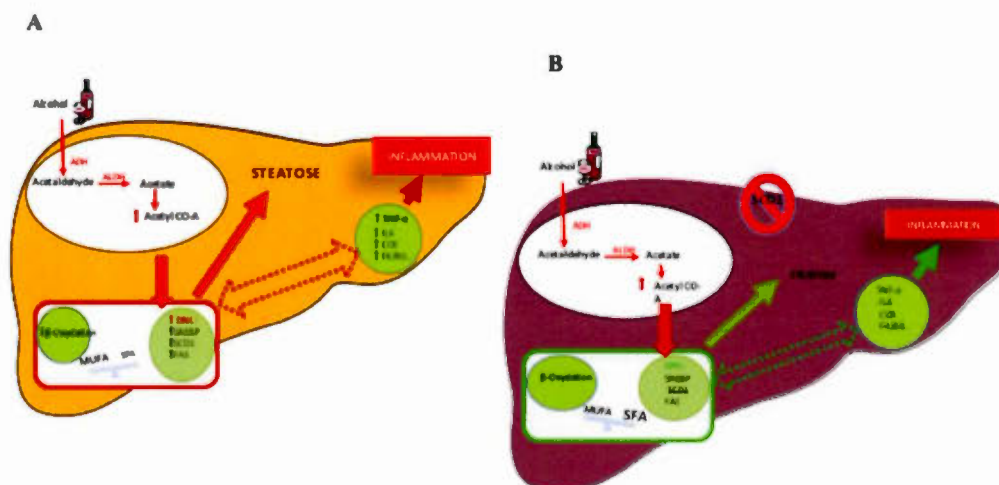
**Figure 4.5. Effect of ethanol feeding on expression of hepatic lipogenic and β-oxidative genes.** Expression (measured by qPCR) of genes associated with lipogenesis (A) and β-oxidation (B) in livers of ethanol-fed WT and SCD1 KO mice. Values represent means  $\pm$  SD (n=6-8). Student t-test: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  versus the corresponding control group.



**Figure 4.6. Effect of ethanol feeding on expression of hepatic inflammation-related genes.** Expression (measured by qPCR) of genes associated with inflammation in livers of ethanol-fed WT and SCD1 KO mice: (A) pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , INF $\gamma$  and IL-6, (B) monocyte markers CCR2 and MCP, and (C) macrophage marker F4/80. Values represent means  $\pm$ SD (n=6-8). Student t-test: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  versus the corresponding control group.



**Figure 4.7. Effect of SCD1 inhibition on ethanol-treated HepG2 cells.** HepG2 cells were incubated or not with ethanol (EtOH) then treated or not with a specific SCD1 inhibitor (A939572). (A) Treated cells were stained with Bodipy 493/503 to visualize lipid droplets. Expression (measured by WB and qPCR) of key genes implicated in lipid metabolism (B) and inflammation (C). Student t-test: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  versus the corresponding control group.



**Figure 4.8. Schematic representation of the role of SCD1 in the development of alcoholic hepatic steatosis.** (A) In the normal liver, ethanol consumption induces an increase in acetyl-CoA, which triggers fatty acid synthesis through elevated expression of key *de novo* lipogenesis (DNL) genes (SREBP, ACC, SCD1, FAS...), and a decrease in  $\beta$ -oxidation of fatty acids. Ethanol induces local inflammation by prompting the expression of pro-inflammatory genes (such as TNF- $\alpha$ ) as well as the infiltration of neutrophils and monocytes/macrophages. (B) SCD1 deficient mice are protected against ethanol-induced liver injury. The liver of SCD1 deficient mice shows no increase in DNL.  $\beta$ -oxidation is increased, probably due to a higher SFA/MUFA ratio. The expression of pro-inflammatory genes remains unchanged.



**Tableau 4.1. Primers sequences for mouse and human genes used in real-time PCR**

Species	genes	Forward primer (5'...3')	Reverse primer (5'...3')
Mouse	SREBP-1	GAGGCCAAGCTTTGGAC CTGG	CCTGCCTTCAGGCTTCTC AGG
	FAS	ATTGCATCAAGCAAGTG CAG	GAGCCGTCAAACAGGAA GAG
	ACC	TGAAGGGCTACCTCTAAT G	TCACAACCCAAGAACCA C
	SCD-1	CTGCCTCTTCGGGATTTT CTACT	GCCCATTCGTACACGTG ATTG
	LXR $\alpha$	ATTAAGGAAGAGGGGCA GGA	GCTGAGCACGTTGTAGT GGA
	PPAR $\alpha$	CTGCAGAGCAACCATCC AGAT	GCCGAAGGTCCACCATT TT
	CPT-1	TCCATGCATACCAAAGT GGA	TGGTAGGAGAGCAGCAC CTT
	TNF- $\alpha$	AAGCCTGTAGCCACGT CGTA	AGGTACAACCCATCGGC TGG
	IFN- $\gamma$	TAGCCAAGACTGTGATT GCGG	AGACATCTCCTCCCATC AGCAG
	IL-6	TCCATCCAGTTGCCTTCT TG	TTCCACGATTGCCAGA GAAC
	MCP-1	TCAGCCAGATGCAGTTA ACGC	TCTGGACCCATTCCTTCT TGG
	CCR2	ATGCAAGTTCAGCTGCCT GC	ATGCCGTGGATGAACTG AGG

Species	genes	Forward primer (5'...3')	Reverse primer (5'...3')
	F4/80	GGAAAGCACCATGTTAG CTGC	CCTCTGGCTGCCAAGTT AATG
	HPRT	TCAGTCAACGGGGGACA TAAA	GGGGCTGTACTGCTTAA CCAG
Human	SREBP -1	ACAGTGACTTCCCTGGCC TAT	GCATGGACGGGTACATC TTCAA
	TNF- $\alpha$	CCTCTCTCTAATCAGCCC TCTG	GAGGACCTGGGAGTAGA TGAG
	HPRT1	CCTGGCGTCGTGATTAGT GAT	AGACGTTTCAGTCCTGTC CATAA



## CHAPITRE V

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

#### 5.1 Conclusion

Le but principal des travaux de cette thèse consistait à savoir si l'inhibition de l'expression et/ou de l'activité de SCD1 pourrait constituer une cible thérapeutique pour la stéatose hépatique. Cependant, avant d'explorer le potentiel thérapeutique de cette protéine nous devions caractériser les mécanismes d'action et le rôle précis de cette enzyme sur le métabolisme lipidique hépatique principalement sur la lipogenèse *de novo* et la  $\beta$ -oxydation mitochondriale.

Nous avons tout d'abord montré, que l'inhibition de l'expression de SCD1 dans le foie induit une diminution de la lipogenèse *de novo* principalement via l'inhibition de l'expression et de la maturation du facteur de transcription SREBP-1c. Pour la première fois, nous avons montré que cette inhibition serait due à l'absence de l'oléate qui serait essentiel pour la maturation de SREBP-1c afin de faciliter sa translocation vers le noyau et d'activer ainsi les gènes lipogéniques.

En effet, nos résultats suggèrent que l'oléate se lierait directement à SREBP-1c. Nous avons aussi montré que l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation observée dans les hépatocytes déficients en SCD1 serait due à une augmentation des taux intracellulaires d'acide gras polyinsaturés ( $\omega$ -3 et  $\omega$ -6).

Dans une deuxième partie, nous avons étudié le rôle de la Seipine dans le développement de la stéatose hépatique qui se développe chez les lipodystrophiques et la relation qui pourrait exister entre la Seipine et SCD1 dans le foie. Notre étude a montré que l'absence de la Seipine chez les patients BSCL2 jouerait un rôle clef dans l'installation et l'aggravation de la stéatose hépatique sévère. Nous avons montré que l'absence de la Seipine induit une augmentation du nombre et un changement de la morphologie des gouttelettes lipidiques associée à une augmentation de la captation des acides gras et de la lipogenèse *de novo*. De façon intéressante, nos résultats montrent aussi que SCD1 et la Seipine colocaliseraient et que l'inhibition de l'expression de SCD1 dans les hépatocytes déficientes en Seipine renverserait le phénotype observé.

Dans la troisième partie, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de l'expression et de l'activité de SCD1 sur le développement et la progression de la stéatose alcoolique. Cette étude a montré que les souris SCD1 déficientes sont résistantes au développement de la stéatose alcoolique. En effet, nous avons observé une diminution de la lipogenèse *de novo* et de l'accumulation des gouttelettes lipidiques chez les souris SCD1 déficientes soumises à une diète liquide pauvre en MUFA supplémentée de 5% d'éthanol pendant 10 jours suivi d'un gavage avec 31% d'éthanol le 11<sup>ème</sup> jour comparé aux souris sauvages nourries avec la même diète. Les acides gras saturés qui sont augmentés suite à l'inhibition de SCD1 favoriseraient la  $\beta$ -oxydation en activant le facteur de transcription PPAR- $\alpha$  et en inhibant la lipogenèse comme décrit dans la première partie. De plus, les souris SCD1 déficientes ne développaient pas d'inflammation associée à la prise d'alcool et ne montraient pas d'infiltration de cellules de Kuppfer (macrophages) comme cela a été observé chez les souris sauvages. Ces effets observés sur le développement de l'AFLD seraient dus à un déséquilibre du contenu lipidique hépatique induisant une accumulation d'acides gras saturés et une diminution du taux d'acides gras mono-insaturés.



## 5.2 Perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse constituent une réelle avancée dans la compréhension du rôle de SCD1 dans l'accumulation hépatique des lipides et de ce fait dans le développement de la stéatose hépatique ainsi que dans la régulation de la lipogenèse *de novo* via l'activation de la maturation de SREBP-1c ainsi que de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras. De plus, nous avons montré que l'inhibition de l'expression et/ou l'activité de SCD1 pourrait constituer une thérapie intéressante pour la stéatose hépatique indépendamment du type de stéatose (non alcoolique ou alcoolique). A l'aide de la bibliographie déjà publiée et des nouvelles connaissances que nous avons générées, cette partie vise à expliquer et discuter les différents résultats obtenus en proposant des perspectives d'études futures qui permettraient d'enrichir les connaissances vis à vis certains mécanismes proposés et d'approfondir certains résultats et mécanismes obtenus.

### 5.2.1 Rôle de SCD1 dans la régulation du métabolisme lipidique

Nous avons montré que l'inhibition de l'expression de SCD1 induit une diminution de la lipogenèse suite à une diminution de l'activation de SREBP-1c et une augmentation de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale due à une augmentation du contenu cellulaire en PUFA. Aussi, nous avons montré que SCD1 jouerait un rôle important dans la formation des gouttelettes lipidiques.

#### 5.2.1.1 Rôle dans la régulation de la lipogenèse *de novo*

Nos résultats du chapitre II montrent que l'inhibition de l'expression et/ou de l'activité de SCD1 induit une diminution de la lipogenèse *de novo* dans les cellules

HepG2 et dans les souris SCD1 déficientes (**Figure.2.2& 2.8**). Cette diminution de la lipogenèse est associée à une diminution de l'expression et de la maturation de SREBP-1c. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études qui ont montré que les souris SCD1 déficientes montrent une diminution de la lipogenèse *de novo* dans le foie et une diminution de l'expression et de la maturation de SREBP-1c (Miyazaki, Dobrzyn, Man, *et al.*, 2004 ; Miyazaki *et al.*, 2007 ; Ntambi *et al.*, 2002).

De façon original, notre étude montre que la diminution de la maturation et de l'expression de SREBP-1c serait due à une absence d'oléate endogène et que l'ajout d'oléate soit exogène dans les cellules en culture soit produit spécifiquement de façon endogène induit une augmentation de la maturation et de l'expression et de la maturation de SREBP-1c et de la lipogenèse *de novo* (**Figure.2.6.B et C & 2.8**). De plus, aucun effet n'a été obtenu avec le palmitoléate (**Figure.2.7 & 2.8**). Ces résultats sont accord avec l'hypothèse émise par l'équipe du Dr. Ntambi (Miyazaki, Dobrzyn, Man, *et al.*, 2004). En effet, les auteurs ont montré que les souris SCD1 déficientes nourries avec une diète riche en fructose montrent une diminution de la lipogenèse hépatique et une diminution de la maturation de SREBP-1c et que l'ajout l'oléate exogène induit une augmentation de la maturation de SREBP-1c mais n'a pas d'effet direct sur la lipogenèse *de novo*. Les auteurs suggéraient alors que l'oléate endogène est essentiel pour la maturation de SREBP-1c, nous l'avons démontré.

Cette hypothèse sur l'importance de l'oléate endogène dans la régulation du métabolisme lipidique hépatique a été confirmée récemment. En effet, le Dr Ntambi et son équipe ont développé des souris SCD1 déficientes qui ont la capacité de produire dans le foie spécifiquement soit de l'oléate (GLS5) ou du palmitoléate en insérant respectivement soit le gène humain SCD5 (oléate) ou le gène murin SCD3 (palmitoléate) (Burhans *et al.*, 2015 ; Liu, X. *et al.*, 2016). L'étude de Burhans *et al* a montré que les souris GLS5 nourries avec une diète riche en sucre (High sucrose) développent une stéatose hépatique contrairement aux souris GLS3 et aux souris

GKO qui sont résistantes au développement d'une stéatose hépatique. Les souris GLS5 montrent aussi un développement du tissu adipeux et un gain de poids. Cependant, la lipogenèse *de novo* n'est pas complètement restaurée. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que l'oléate endogène serait donc essentiel pour la régulation de l'homéostasie lipidique du tissu adipeux (Burhans *et al.*, 2015). Cette augmentation partielle de la maturation de SREBP-1c après l'ajout de l'oléate peut être expliquée par l'existence d'autres mécanismes modulés régulant la lipogenèse *de novo*. En effet, après l'ajout d'oléate (dans les cellules HepG2 ou dans les souris GLS5), le taux d'AGS reste augmenté comparé aux cellules contrôles. En effet, il a été montré que l'augmentation du taux cellulaire d'AGS induit une augmentation de la phosphorylation de AMPK qui va induire une phosphorylation de l'ACC induisant son désactivation et menant ainsi à une diminution de la lipogenèse *de novo* (Jump, 2011). De plus, une autre étude a montré que les AGS induisent une polymérisation de l'ACC induisant son inactivation et menant à la diminution de la lipogenèse *de novo* (Desvergne et Wahli, 1999).

Une autre étude récente a aussi confirmé le rôle important que joue l'oléate dans l'homéostasie hépatique. En effet, l'oléate semble être indispensable pour protéger le foie contre le stress du RE et de l'inflammation induite par une diète lipogénique (riche en sucrose) chez les souris GLS5 au niveau du foie (Liu, X. *et al.*, 2016). En effet, les souris GLS5 montrent une diminution de l'expression des gènes impliqués dans le stress du RE et l'expression des cytokines inflammatoires comparées aux souris SCD1 déficientes spécifiquement dans le foie sans doute due à l'augmentation du ratio MUFA/PUFA (Liu, X. *et al.*, 2016).

Pour la première fois, nous avons montré que l'oléate est capable de lier SREBP-1c. Cette observation est cruciale et pourrait s'expliquer par trois mécanismes différents qui doivent être explorés plus en détails :

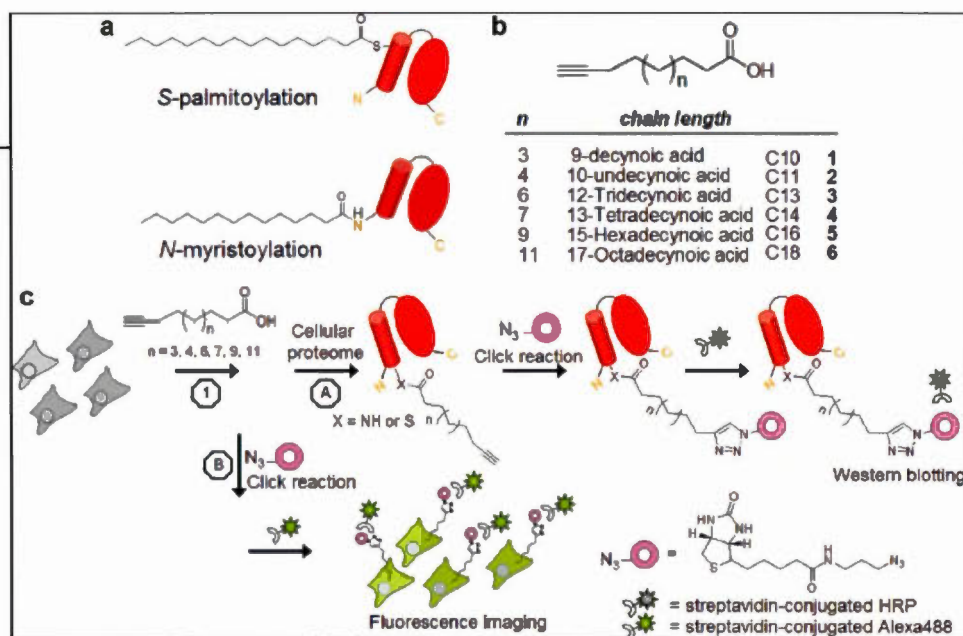
- 1) L'oléate pourrait aussi réguler l'expression transcriptionnelle de SREBP-1c.
- 2) L'oléate pourrait se lier à la fraction mature de SREBP-1c directement pour faciliter sa translocation en changeant sa conformation dans le noyau et activer ainsi les gènes lipogéniques.
- 3) L'oléate pourrait être reconnu par une protéine senseur (au niveau du RE), qui peut être le précurseur de SREBP-1c, ce qui va permettre la translocation du complexe SREBP-1c-SCAP vers la membrane du Golgi et déclencher ainsi son clivage par les protéases SP1 et SP2 menant à l'activation de la maturation de SREBP-1c.

Il faudrait dans un premier temps explorer l'effet de l'oléate (endogène ou exogène) sur la transcription de SREBP-1c. Pour cela nous pourrions incuber des cellules avec de l'oléate ou en surexprimant SCD1 au moyen d'un vecteur d'expression dans des cellules, afin d'induire une surproduction d'oléate endogène.

Nous utiliserons le promoteur de SREBP-1c cloné en amont du gène luciférase. L'activité luciférase sera mesurée afin d'évaluer l'impact soit de la surproduction d'oléate ou de l'addition d'oléate exogène sur l'activité promotrice du gène SREBP. Si nos résultats montrent bien un effet de l'oléate sur l'activité promotrice, des délétions séquentielles ou des mutations ponctuelles pourront être envisagées pour identifier les zones de réponse à l'oléate.

Une technique identifiée récemment permettrait de confirmer nos résultats sur la liaison de l'oléate et nous permettrait de connaître les acides aminés impliqués dans cette liaison. En effet, nous pourrions utiliser la technique de marquage des acides gras avec une sonde fluorescente d'alkyl (alkynyl fatty acid probes) permettant le suivi en temps réel de son métabolisme (Charron *et al.*, 2009 ; Hannoush et Arenas-

Ramirez, 2009 ; Hannoush et Sun, 2010). Cette technique est décrite dans la **Figure 5.1** (Hannoush et Arenas-Ramirez, 2009).



**Figure 5.1. Marquage et identification de protéines cellulaires avec des acides gras  $\omega$ -alkynylés bioorthogonaux.** a) Structures chimiques des groupes N-myristate et S-palmitate attachés de façon covalente aux protéines. b) Différents acides gras synthétiques  $\omega$ -alkynylés. c) Procédure pour le marquage cellulaire des protéines modifiées par des acides gras analogues. Les acides gras synthétiques  $\omega$ -alkynylés sont ajoutés aux milieux de culture et seront incorporés métaboliquement en traversant la membrane cellulaire aux protéines acylés (modification par les acides gras). Par la suite, le groupe alkyl se lie à un azide ( $N_3$ ) couplé à une biotine marquée ou un fluorochrome. Les protéines conjuguées sont par la suite séparées par électrophorèse sur gel d'agarose et détectées par une streptavidine couplée à HRP (A) ou détectées par une streptavidine couplée à un anticorps Alexa 488 et visualisées par microscopie à fluorescence, et en incubant les cellules avec un anticorps primaire anti-SREBP-1c puis avec un anticorps secondaire qui reconnaît l'anticorps primaire couplée à un Alexa-647.



La protéine SREBP-1c couplée éventuellement à l'oléate alkylé selon la technique décrite plus haut pourrait être immunoprécipitée puis migrée sur gel par la suite la bande sera analysée par LC/MS. Ceci va permettre de déterminer les acides aminés (aa) impliqués dans la liaison de SREBP-1c à l'oléate (Hannoush et Sun, 2010). Par la suite, des constructions tronquant les acides aminés impliqués pourront être transfectées dans les cellules HepG2 afin de confirmer l'implication spécifique des aa mutés.

Il a été montré dans la littérature que la protéine Wnt3a subit une modification post-traductionnelle préférentiellement par le palmitoléate mais faiblement par l'oléate (Takada *et al.*, 2006). L'enzyme responsable de cette acylation est la Porcupine (Nile et Hannoush, 2016 ; Takada *et al.*, 2006). Dans notre étude nous avons vérifié l'éventuelle implication de la Porcupine dans l'acylation de SREBP-1c. Nous avons incubé les cellules HepG2 avec de l'oléate radioactif en présence d'un inhibiteur de Porcupine (LGK974, Millipore®) et quantifié la radioactivité sur la bande correspondante à la SREBP-1c après immunoprécipitation. Nos résultats ne montrent pas de différence dans les comptes de radioactivité dans la bande de SREBP-1c pour les cellules en présence d'inhibiteur de Porcupine comparé aux cellules sans inhibiteur. Ces résultats suggèrent l'implication d'une autre enzyme dans l'acylation de SREBP-1c. En effet, la Porcupine fait partie d'une famille de protéines localisées sur la membrane de RE composée de 11 membres. Cette famille de protéines est appelée la membrane bound O acyltransferase protein (MBOAT) et chaque membre possède un mécanisme et un substrat préférentiel (Hofmann, 2000 ; Masumoto *et al.*, 2015).

Pour cela, il sera utile de voir l'effet de l'inhibition de ces différentes enzymes sur la liaison de l'oléate à SREBP-1c. Nous incuberons les cellules HepG2 avec l'oléate radioactif (modifié comme décrit précédemment) en présence d'un inhibiteur

spécifique de chaque enzyme (une par une) et voir l'effet sur la liaison en détectant SREBP-1c comme décrit en haut.

#### 5.2.1.2 Rôle dans la régulation de la $\beta$ -oxydation mitochondriale

Nous avons montré que l'inhibition de l'expression de SCD1 dans les cellules HepG2 induit une augmentation de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale caractérisée par une augmentation de l'expression de PPAR- $\alpha$ , le facteur de transcription responsable de l'activation des principaux gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale tel que CPT1 (**Figure.2.3.A**). Ces résultats sont en accord avec des travaux précédemment publiés ayant montré que les souris SCD1 déficientes montrent une augmentation de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale caractérisée par une augmentation de l'expression hépatique de PPAR- $\alpha$  et de CPT-1 (Dobrzyn, P. *et al.*, 2004 ; Ntambi *et al.*, 2002).

Cependant, le mécanisme d'action induisant cette augmentation reste inconnu. Dobrzyn *et al.*, ont suggéré que l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale observée serait probablement due à une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK (Dobrzyn, P. *et al.*, 2004). En effet, les auteurs suggèrent que l'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK observée va induire une augmentation de la phosphorylation de l'ACC ce qui va induire une diminution de son activité. La diminution de l'activité de ACC induit une diminution du taux cellulaires de malonyl-CoA (Dobrzyn, P. *et al.*, 2004). Il est connu que le malonyl-CoA est inhibiteur allostérique de CPT1 (Thupari *et al.*, 2002). En effet, les souris SCD1 déficientes montrent une diminution de 2 fois des taux hépatiques de malonyl-CoA diminuant ainsi l'inhibition de l'activité de CPT-1 (Dobrzyn, P. *et al.*, 2004). De plus, il a aussi été montré que l'augmentation de l'activité de l'AMPK observée peut augmenter directement l'activité de CPT1 et CPT-2 (Velasco *et al.*, 1998).

Cependant, les auteurs n'ont pas proposé de mécanisme expliquant l'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK observée chez les souris SCD1 déficientes.

Pour confirmer ces observations, il serait intéressant de mesurer les niveaux d'expression protéique et le niveau de phosphorylation par immunobuvardage (WB) d'ACC et de l'AMPK. Il serait intéressant aussi de mesurer le contenu cellulaire de malonyl-CoA par un kit ELISA (MyBioSource).

Dans notre étude, nous avons aussi observé une augmentation du contenu hépatique des acides gras polyinsaturés ( $\omega$ -3 et  $\omega$ -6) (**Figure.2.4**). Il a été montré qu'une augmentation du taux cellulaire de PUFA induirait une augmentation de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. En effet, les  $\omega$ -3 ont en effet la capacité de se lier directement à PPAR- $\alpha$  activant ainsi l'expression des gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale comme CPT-1 et CPT-2 (Chakravarthy *et al.*, 2009 ; Chakravarthy *et al.*, 2005 ; Dossi *et al.*, 2014 ; Lopez-Dominguez *et al.*, 2016). Une autre possibilité envisagée est que les PUFA peuvent réguler l'activité transcriptionnelle de PPAR- $\alpha$  en se liant directement à son promoteur. Il serait alors intéressant de regarder cela en isolant le promoteur de PPAR- $\alpha$  en le clonant dans un vecteur de type pGL2 (Promega®) couplé à un gène luciférase. Nous effectuerons par la suite des transfections dans des cellules HepG2 incubées avec différents PUFA (oméga-3 et oméga-6) et observons l'impact sur le niveau d'expression de la luciférase.

Les cellules humaines ont la capacité de synthétiser les PUFA par l'intermédiaire des désaturases appelées FAD (fatty acid desaturases) (Lee, J. M. *et al.*, 2016). Il existe 3 isoformes de FAD, FAD1, FAD2 et FAD3, les gènes codant pour ces isoformes sont localisés sur le chromosome 11 (Marquardt *et al.*, 2000). L'expression de ces FAD est régulée principalement par l'acide linoléique (LA, 18 :2-n6) et l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA, 18 :3n-3) apportés par l'alimentation. Cependant, une faible quantité

seulement de PUFA qui ont plus que 20 carbones peuvent être synthétisés par ces désaturases dans les cellules humaines (Lee, J. M. *et al.*, 2016).

À la lumière de ces données de la littérature, nous pourrions penser que l'augmentation du taux cellulaires de PUFA observée dans les cellules HepG2 déficientes en SCD1, serait due à un mécanisme cellulaire compensatoire. En effet, l'absence d'acides gras mono-insaturés dans les cellules pourrait enclencher via un mécanisme encore inconnu (probablement via un senseur), un phénomène permettant aux cellules de stocker les PUFA au lieu de les oxyder. Étant donné que la production des PUFA dans les cellules humaines est faible, on pourrait penser que l'activité des FAD dans ces conditions serait stimulée. Cela reste à vérifier et la mesure du niveau d'expression des FAD ainsi que leur niveau d'activité dans les foies de souris déficientes dans les cellules sur- ou sous-exprimant SCD1 pourraient être évalués. Une étude transcriptionnelle permettant d'évaluer l'activité du promoteur des différentes FAD en présence de palmitoléate ou d'oléate pourrait aussi être envisagée. Nous pourrions également observer l'impact de ces acides gras sur la transcription des FAD dans des cellules HepG2 incubées avec des doses croissantes de palmitoléate ou d'oléate.

Pour confirmer le rôle des FAD spécifiques, nous pourrions inhiber leur expression dans des souris SCD1 déficientes ou grâce à des siRNA dans les cellules et évaluer l'impact sur la  $\beta$ -oxydation et le développement de la stéatose hépatique en réponse à une diète riche en sucres.

Cependant le niveau élevé de PUFA pourrait résulter d'une inhibition de leur dégradation. La  $\beta$ -oxydation des PUFA à 22 carbones et plus se passe dans les peroxysomes. La première étape est catalysée par l'acyl-CoA oxydase, les résidus acylés ainsi obtenus traversent la membrane des peroxysomes par l'intermédiaire d'une carnitine acyltransférase peroxisomale, Carnitine O-palmitoyltransférase, différente des CPT1 et CPT2 des mitochondries (Sprecher, 2002).

### **5.2.2 Rôle de la Seipine et de SCD1 dans le développement et la formation de la stéatose hépatique et des gouttelettes lipidiques chez les patients atteints de BSCL2**

#### **5.2.2.1 Effet de l'inhibition de la Seipine**

Dans le chapitre III, nous avons montré que la Seipine jouerait un rôle important dans la formation et l'homéostasie des gouttelettes lipidiques dans le foie (**Figure.3.1**). Nos résultats sont en accord avec des études de la littérature qui ont montré que dans d'autres systèmes, la Seipine joue un rôle important dans la formation des gouttelettes lipidiques (Fei *et al.*, 2008 ; Tian *et al.*, 2011 ; Yang, W. *et al.*, 2013).

En effet, Fei et al ont montré que l'inhibition de l'expression de fldlp, l'homologue fonctionnel de la Seipine humaine, induit chez la levure une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques. Les auteurs ont observé que l'inhibition de l'expression de la Seipine résulte en la formation d'une gouttelette lipidique de très grande taille ou la formation d'un agrégat de gouttelettes lipidiques suggérant un rôle important de la Seipine dans la formation et la stabilisation des gouttelettes lipidiques (Fei *et al.*, 2008). Des études plus récentes ont aussi confirmé les résultats précédents, montrant un rôle important de la Seipine dans la stabilisation de la gouttelette lipidique et que cette stabilisation se ferait à la jonction entre la membrane du RE et de la gouttelette lipidique (Grippa *et al.*, 2015 ; Wolinski *et al.*, 2015 ; Wolinski *et al.*, 2011).

Nous avons observé des résultats semblables au niveau hépatique. Nos résultats montrent que l'inhibition de l'expression de la Seipine dans les hépatocytes induit une augmentation du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques. En effectuant une étude en temps réel afin d'étudier l'effet de l'inhibition de la Seipine sur la formation des gouttelettes lipidiques, nous avons observé une expansion des gouttelettes lipidiques beaucoup plus importante comparée aux cellules contrôles. Nous avons aussi observé une augmentation des phénomènes de fusion des



gouttelettes lipidiques. En effet, en absence de Seipine, les gouttelettes lipidiques dans notre étude avaient tendance à fusionner et à s'agréger de façon plus importante et cela contrairement aux cellules contrôles. A l'opposé, dans les cellules contrôles nous avons observé une tendance à la dégradation des gouttelettes lipidiques.

Nous avons montré aussi que l'absence de la Seipine induit une augmentation de la captation des acides gras et de la lipogenèse *de novo* (Figure.3.2 & 3.3). En effet, nous avons observé une augmentation de la captation des acides gras dans les cellules HepG2 et les hépatocytes primaires de rats transfectés avec les siRNA Seipine. Ces résultats sont corrélés à une augmentation de l'expression de PPAR- $\gamma$  et de FAT/CD36. Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus chez les souris Seipine déficientes où les auteurs ont observé une augmentation de l'expression de PPAR- $\gamma$  et de FAT/CD36 ainsi qu'une augmentation de la lipogenèse *de novo* caractérisée par une augmentation de l'expression des différents gènes lipogéniques (FAS, ACC, SREBP-1C et SCD1) dans le foie (Cui *et al.*, 2011 ; Prieur *et al.*, 2013).

Nos résultats observés lors de la déficience hépatique de Seipine, à savoir l'accumulation des gouttelettes lipidiques, l'augmentation de la captation des acides gras et de la lipogenèse *de novo* suggèrent que l'absence de la Seipine en plus de son effet au niveau du TA, jouerait un rôle dans le développement et la formation de la stéatose hépatique chez les patients atteints de la lipodystrophie congénitale de Berrardineli-Seip.

Plusieurs autres études récentes suggèrent par contre que la stéatose hépatique serait une résultante de l'absence de tissu adipeux et que l'absence de Seipine hépatique n'aurait pas d'effet (Chen, W. *et al.*, 2014 ; Gao *et al.*, 2015 ; Liu, L. *et al.*, 2014). En effet, Chen *et al* ont montré que des souris Seipine déficientes spécifiquement dans le foie et nourries avec une diète normale ne développent pas de stéatose hépatique. Lorsqu'elles sont soumises à une diète riche en gras, les souris Seipine déficientes spécifiquement au niveau du foie et âgées de 3 mois ne développent pas de stéatose

plus grave que la stéatose observée chez les souris sauvages (Chen, W. *et al.*, 2014). Cependant, les auteurs ont utilisé dans leur étude des souris âgées de 3 mois. La stéatose hépatique chez les souris GKO ne se développe que plus tard, il serait donc intéressant de voir l'effet de l'absence de l'expression de la Seipine dans le foie à plus long terme. De plus, l'utilisation d'une diète riche en gras pour voir une différence entre les souris Seipine déficientes dans le foie et les souris sauvages n'est pas le meilleur choix. En effet, cette diète va induire une saturation du système du fait qu'il va y avoir une grande quantité de TG circulants ainsi il n'est pas facile de voir si la stéatose hépatique est plus intense ou pas dans les deux groupes de souris utilisés. Ceci est d'autant plus vrai que les patients Seipine, de même que les souris GKO, ne présentent pas d'hypertriglycémie.

Une autre étude a montré que les souris déficientes en Seipine mais l'exprimant spécifiquement dans le tissu adipeux, ne développent pas de stéatose hépatique ni d'insulino-résistance (Gao *et al.*, 2015). Ces résultats confirment ainsi les résultats précédents montrant que la Seipine ne joue pas un rôle primordial dans la pathologie de la formation de la stéatose hépatique mais nos résultats démontrent qu'elle l'aggrave car l'augmentation de la lipogenèse et la captation des AG sont observées au niveau hépatique. Notre étude a en effet clairement démontré que la Seipine a un rôle dans la formation et l'homéostasie des gouttelettes lipidiques au niveau hépatique.

Nous nous sommes aussi intéressés à étudier l'effet de l'absence de la Seipine dans le foie sur la signalisation à l'insuline dans les cellules en culture mais aussi dans des souris Seipine déficientes âgées de 3 mois (avant l'apparition d'une stéatose hépatique). En effet, les études précédentes ont montré que les souris âgées de 4 mois montrent une stéatose hépatique associée à une insulino résistance (Cui *et al.*, 2011 ; Prieur *et al.*, 2013). Cependant, dans notre étude nous avons montré le contraire à savoir une hypersensibilité à l'insuline (**Figure.3.6**). De plus, nos résultats suggèrent

aussi que l'augmentation de la sensibilité à l'insuline observée dans les cellules en culture et chez les souris Seipine déficientes âgées de 3 mois contribuerait à favoriser d'avantage la captation des acides gras et la lipogenèse *de novo* et donc aggraverait la stéatose.

Nous suggérons alors que dans les premiers stades de la lipodystrophie congénitale de Berrardineli-Seip, il va y avoir une augmentation de la lipogenèse *de novo* et surtout une captation des acides gras car la résistance à l'insuline n'est pas encore installée. Ces deux effets vont être aggravés par une sensibilité à l'insuline plus élevée induisant ainsi un stockage et une synthèse de TG à de très grande quantité dans les hépatocytes. Cette augmentation du taux cellulaire de TG va induire une lipotoxicité cellulaire qui va agir sur les récepteurs à l'insuline induisant ainsi le développement d'une stéatose hépatique majeure. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait en premier lieu comprendre la séquence d'apparition des troubles métaboliques associés à la déficience en Seipine. Pour cela, il faudrait effectuer des expériences sur des souris Seipine déficientes et des souris Seipine déficientes spécifiquement au niveau du foie. Dans cette étude, il faudrait nourrir un groupe de souris sauvages, Seipine déficientes et Seipine déficientes spécifiquement au niveau du foie avec une diète normale et les sacrifier à un âge avancé (à partir de 6 mois au moins moment où les souris ont une stéatose hépatique) et regarder l'effet sur la formation de la stéatose hépatique et sur la résistance à l'insuline.

Des analyses similaires sur les mêmes groupes de souris mais nourries avec une diète déficiente en méthionine et choline (MCD) pendant 8 semaines pourrait être aussi envisagé. Il est connu que cette diète est celle qui induit le plus de dommage sur le foie des souris en lien avec un développement majeur de l'inflammation (Takahashi, Soejima et Fukusato, 2012).

Dans ces deux études nutritionnelles, nous pourrions étudier l'effet de l'inhibition de la Seipine (Seipine déficientes et Déficientes spécifiquement dans le foie) sur le

métabolisme des lipides, en effectuant des analyses sur la lipogenèse *de novo* (mesure directe par injection avec de l'eau radioactive) et indirecte en analysant l'expression des gènes et des protéines lipogéniques (SCD1, FAS, ACC, SREBP-1c) respectivement par QPCR et par WB.

Nous analyserons aussi la  $\beta$ -oxydation et la captation des acides gras en évaluant l'expression génique et protéique par QPCR et par WB des acteurs clés de ces deux voies métaboliques. Nous analyserons aussi par mesure directe en temps réel de la respiration mitochondrial dans les cellules HepG2 traitées par l'analyseur de flux extracellulaire XF24 (Seahorse Bioscience®) en suivant les instructions du manufacturier (Kim, Y. I. et al., 2011).

Il serait essentiel d'étudier dans ces souris la sensibilité à l'insuline et surtout au cours du développement de la stéatose afin d'identifier le moment d'installation de la résistance à l'insuline et cela en effectuant des tests de tolérance au glucose (GTT) et à l'insuline et en dosant le taux d'insuline circulante. La GTT sera effectuée de la manière suivante, après ingestion d'une quantité fixe de glucose par injection intrapéritonéale (1g/kg) et en suivant les variations de concentration de glucose plasmatiques pendant 2 heures par un glucomètre. Pour l'ITT, elle sera effectuée en injectant de l'insuline aux souris (0,5U/kg) et en mesurant la diminution de la glycémie pendant les 15-30 minutes suivant l'injection. Les mesures de la glycémie seront effectuées par un glucomètre comme pour la GTT. Les concentrations circulantes d'insuline seront mesurées en effectuant des prises de sang tout au long du protocole et en quantifiant le taux d'insuline sanguin par un kit ELISA (Dako).

De plus nous avons aussi montré que les hépatocytes déficients en Seipine ont une augmentation de l'expression des marqueurs du stress du RE (**Figure.3.7**). Des études ont montrés que le stress du RE jouerait un rôle important dans la stéatose hépatique non alcoolique en activant l'expression du facteur de transcription SREBP-1c qui lui, va activer les gènes de la lipogenèse *de novo* (FAS, ACC, SCD1) induisant

l'installation d'une stéatose hépatique grave (Fang *et al.*, 2013 ; Puri, P. *et al.*, 2008). De plus, une autre étude a montré que l'absence de l'expression de la Seipine dans les cellules neuronales induit l'accumulation de gouttelettes lipidiques, de TG et montrent une augmentation de l'expression des marqueurs du stress du RE principalement de la protéine CHOP (Holttä-Vuori *et al.*, 2013). Nos résultats soutiennent donc le lien entre l'inflammation et le développement de la stéatose hépatique.

#### 5.2.2.2 Relation entre Seipine et SCD1

Nous avons aussi montré qu'il existerait une relation fonctionnelle entre la Seipine et SCD1 (Figure.3.5). Les cellules HepG2 déficientes en Seipine présentent une augmentation de l'expression de SCD1 (**Figure.3.4.B**) mais aussi une augmentation de son activité caractérisée par une augmentation du ratio AGMI/AGS (**Figure.3.5.E**). Nos résultats sont en accord avec des données de la littérature montrant une augmentation de l'expression hépatique de SCD1 dans les souris Seipine déficientes (Cui *et al.*, 2011 ; Prieur *et al.*, 2013). De plus, une étude a également montré que les cellules lymphoblastiques de patients atteints de BSCL2 présentent une diminution du ratio des AGMI/AGS suggérant aussi une diminution de l'activité de SCD1 dans ces cellules (Boutet *et al.*, 2009).

Nos résultats suggèrent aussi que l'augmentation du taux intracellulaire d'AGMI dû à l'augmentation de l'activité de SCD1 observé dans les cellules Seipine déficientes serait à l'origine de plusieurs phénotypes observés. En effet, il a été montré que l'augmentation de l'expression de SCD1 induit une expansion des gouttelettes lipidiques due à une grande synthèse d'AGMI qui sont stockés dans les gouttelettes lipidiques (Arisawa *et al.*, 2013 ; Shi *et al.*, 2013), expliquant ainsi l'augmentation de



la taille des gouttelettes lipidiques observée dans notre étude dans les cellules déficientes en Seipine (**Figure.3.1**).

De plus, il a été montré dans la littérature ainsi que dans notre étude (Chapitre II), qu'une augmentation du taux cellulaire d'oléate active la maturation de SREBP-1c en s'y liant, induisant une augmentation de l'expression des gènes lipogéniques et de la lipogenèse *de novo* dans le foie (Miyazaki, Dobrzyn, Man, *et al.*, 2004). D'autres études ont montré que l'augmentation du taux cellulaire d'AGMI améliorent la sensibilité à l'insuline en stimulant sa voie de signalisation (Coll *et al.*, 2008 ; Nardi *et al.*, 2014). Ces observations pourraient expliquer l'hypersensibilité à l'insuline observée dans les cellules HepG2 Seipine déficientes ainsi que chez les souris jeunes (**Figure.3.6**).

Ces données de la littérature ainsi que nos résultats suggèrent donc qu'il existe une relation entre SCD1 et la Seipine. De plus nous avons montré dans le chapitre II que l'inhibition de l'expression de SCD1 dans les hépatocytes induit un phénotype opposé à celui observé en inhibant l'expression de la Seipine. Ces résultats suggèrent un rôle opposé de ces deux protéines dans le foie et principalement dans la formation des gouttelettes lipidiques. De plus, nous avons montré que SCD1 et la Seipine colocalisent dans les hépatocytes et peut être interagissent (**Figure.3.5.A**), comme montré par les analyses d'immunoprécipitation. Cependant, afin de confirmer les résultats obtenus suggérant une relation entre SCD1 et la Seipine ainsi qu'un potentiel thérapeutique de SCD1 pour les patients atteints de BSCL2, des études complémentaires seront nécessaires.

Pour confirmer la relation entre SCD1 et la Seipine, il faut en premier lieu voir s'il existe clairement une interaction physique directe ou indirecte entre ces deux protéines. Nous pourrions pour cela utiliser le modèle des levures. Pour cela, nous exprimerons les gènes SCD1 (*Ole1*) et Seipine (*Fld1p*) en utilisant des vecteurs codant aussi pour deux fluorochromes différents. Il serait intéressant aussi de voir

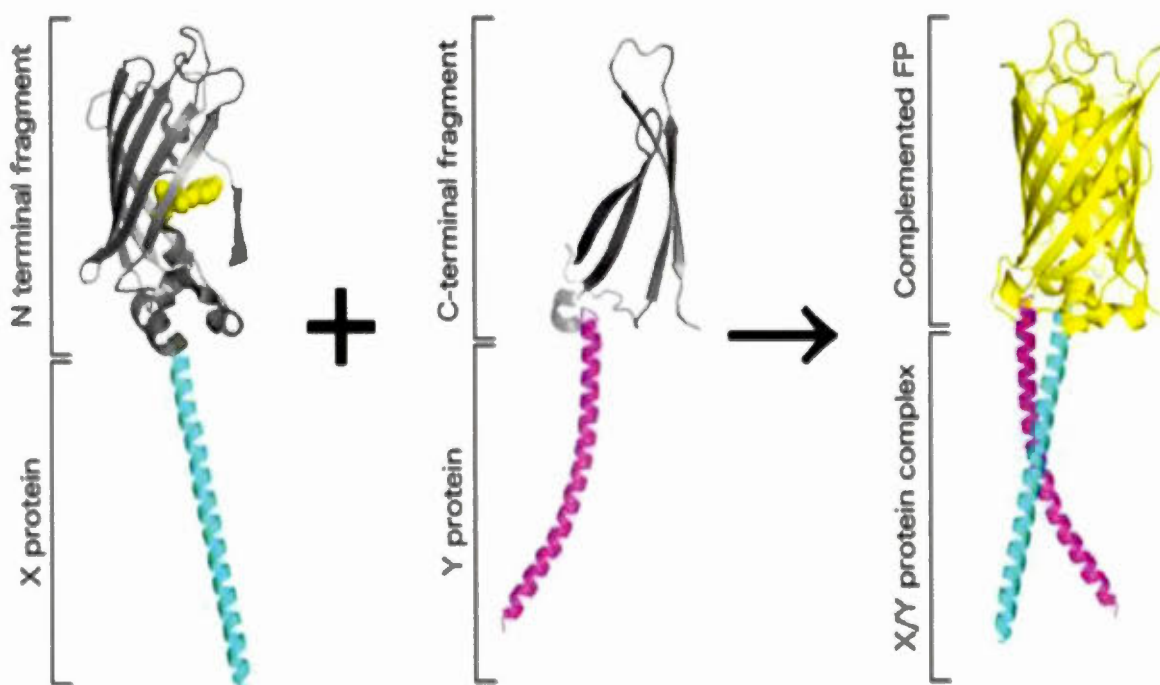
dans quel compartiment cellulaires ces deux protéines colocalisent en effectuant un marquage spécifique du RE et du noyau. Ceci va permettre de connaître l'endroit exact de localisation de ces deux protéines. Ce résultat pourrait par la suite être confirmé dans les cellules HepG2. Nous pourrions aussi visualiser l'interaction potentielle entre ces deux protéines en utilisant la technique de *la bimolecular fluorescence complementation* (BiFC). Cette technique consiste à fusionner un fragment N-terminal d'une protéine fluorescente BiFC avec la protéine d'intérêt. La deuxième protéine d'intérêt sera elle fusionnée avec le fragment C-terminal de la même protéine fluorescente BiFC. Pour cela, il faudra cloner les gènes de la Seipine et de SCD1 dans des vecteurs contenant la partie C-terminal et N-terminal de la protéine BiFC respectivement. Par la suite, les deux vecteurs seront transfectés dans un premier temps dans la levure, puis les expériences seront confirmées dans les cellules HepG2. L'interaction sera observée par microscopie confocale en temps réel (Hu, C. D., Chinenov et Kerppola, 2002). Si les deux protéines interagissent ensemble les parties C-terminale et N-terminale de la protéine BiFC se lieront et une fluorescence sera générée (**Figure.5.2**).

### **5.2.3 Rôle de SCD1 et relation avec d'autres protéines du RE dans la formation des gouttelettes lipidiques**

Nous avons montré dans notre étude une relation entre SCD1 et la Seipine (Chapitre III). De plus, nos résultats du chapitre II ont montré une relation entre SREBP-1c et SCD1. Ces trois protéines sont localisées sur le RE (Cartwright et Goodman, 2012 ; Miyazaki et Ntambi, 2003 ; Sato, 2009).

Une étude de la littérature révèle que la Seipine interagit avec deux autres protéines qui joueraient un rôle important dans la formation des gouttelettes lipidiques et dans la synthèse des TG et des phospholipides. Plus précisément, une étude révèle qu'il

existerait une interaction directe entre la Seipine et AGPAT2 et la Lipin 1 (Talukder *et al.*, 2015).



**Figure 5.2. Principe du BiFC.** Un fragment N-terminal de BiFC (VN155) est fusionné avec la protéine d'intérêt (Seipine par exemple), la partie jaune représente le fluorophore (à gauche). Le fragment C-Terminal de BiFC (VC155) est lui fusionné avec la deuxième protéine d'intérêt (SCD1 par exemple) (milieu). Lorsqu'il y a interaction la protéine fluorescente est reconstituée (FP) et sera visualisée par microscopie confocale (Kodama et Hu, 2012).

De plus une autre étude a montré que DGAT2 et SCD1 colocaliseraient suggérant aussi une interaction entre ces deux protéines (Man *et al.*, 2006). Toutes ces données de la littérature, ainsi que nos résultats obtenus, suggèrent fortement l'existence d'un réseau protéique entre ces différentes protéines et probablement d'autres protéines

impliquées dans la formation des gouttelettes lipidiques et dans la synthèse des TG et des phospholipides.

Il serait intéressant d'étudier cela dans des études futures. Pour cela, il serait judicieux d'utiliser le modèle des levures qui expriment ou coexpriment différentes protéines du RE (SCD1, Seipine, SREPB-1c, DGAT, AGPAT, FIT...). Des études en microscopie seront par la suite effectuées pour étudier la colocalisation de ces protéines avec des marqueurs du RE et de la membrane nucléaire et des gouttelettes lipidiques. Par la suite nous utiliserons des levures qui expriment des formes mutées de ces protéines afin de comprendre l'effet des différentes mutations induisant l'absence de ces protéines sur la formation des gouttelettes lipidiques. Des expériences similaires à celles décrites plus haut pour l'interaction seipine-SCD1 pourraient être envisagées.

Une fois les études effectuées sur la levure et les principales protéines impliquées dans la formation des gouttelettes lipidiques identifiées, nous passerons par la suite aux lignées cellulaires sur exprimant et/ou sous exprimant ces protéines afin de confirmer les résultats obtenus sur les levures.

#### **5.2.4 SCD1 : une cible thérapeutique pour la stéatose hépatique**

De façon intéressante, nos résultats ont montré que l'inhibition conjointe de l'expression de SCD1 et de la Seipine dans les hépatocytes restaure un phénotype normal (**Figure.3.5**). Ces résultats suggèrent donc que SCD1 pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante pour diminuer la stéatose hépatique chez les patients atteints de BSCL2. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes qui ont montré que les souris SCD1 déficientes sont résistantes au développement d'une stéatose non alcoolique induite par une diète obésogène (Ntambi *et al.*, 2002).



Cependant, nos résultats sont encore préliminaires et il faudrait confirmer ces résultats en utilisant des modèles plus appropriés. En effet, il serait intéressant de voir l'effet de l'inhibition de l'expression de SCD1 sur les souris Seipine déficientes. Pour cela, il existe plusieurs façons de procéder. Pour cibler juste le foie, nous pourrions inoculer les souris Seipine déficientes avec un adénovirus atténué contenant un shRNA SCD1. L'adénovirus est un virus qui se multiplie dans les voies bronchiques mais se retrouve en grande quantité dans le foie (Hoeben et Uil, 2013). Nous avons tenté d'effectuer cette analyse sur les souris Seipine déficientes mais les résultats n'ont pas été concluants car l'inhibition de l'expression de SCD1 dans ces souris n'était pas efficace. En effet, nous n'avons obtenu qu'une inhibition de 20% de l'expression de SCD1 et qui n'a pas été maintenue avec le temps. Pour cela, il serait utile de générer d'abord des souris double déficientes et de regarder le phénotype de ces souris et l'effet de l'inhibition de SCD1 sur la stéatose hépatique, l'absence du tissu adipeux et la résistance à l'insuline.

Dans notre dernier chapitre (Chapitre IV), nous avons montré pour la première fois que les souris SCD1 déficientes sont résistantes au développement de la stéatose hépatique alcoolique. En effet, nos résultats montrent que ces souris contrairement aux souris sauvages ne développent pas de stéatose hépatique alcoolique. En effet, ces souris ne montrent pas d'augmentation de l'accumulation des gouttelettes lipidiques et de la lipogenèse *de novo* ni de diminution de la  $\beta$ -oxydation. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans l'étude du Dr Ntambi sur le développement d'une stéatose non alcoolique induite par une diète obésogène (Ntambi *et al.*, 2002). En effet, les auteurs montrent que l'inhibition de l'expression de SCD1 induit une diminution de la lipogenèse *de novo* et une augmentation de la  $\beta$ -oxydation comparé aux souris sauvages lorsqu'elles sont toutes les deux nourries avec une diète riche en gras (Ntambi *et al.*, 2002).



Dans notre étude, les souris SCD1 déficientes nourries avec une diète liquide supplémentée de 5% d'éthanol suivi d'un gavage avec 31% d'éthanol ne montrent aucun signe d'inflammation hépatique contrairement aux souris sauvages. En effet, nous avons observé une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et nous n'avons pas observé d'infiltration de cellules de Kupffer dans le foie de ces souris contrairement aux souris sauvages. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature où des études ont montré que l'inhibition de l'expression de SCD1 induit une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires principalement de TNF- $\alpha$  dans les adipocytes (Liu, X. *et al.*, 2010 ; Liu, X., Strable et Ntambi, 2011). Cependant, le mécanisme moléculaire induisant cette diminution de l'inflammation reste obscur. Cependant, les données de la littérature sont intéressantes étant donné que la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  jouerait un rôle important dans la pathogenèse de la stéatose hépatique alcoolique. En effet, cette cytokine est sécrétée en grande quantité par les cellules de Kupffer (macrophages du foie) et jouerait un rôle important dans l'activation de plusieurs voies métaboliques (Liu, J., 2014). De plus, l'augmentation hépatique de la production de TNF- $\alpha$  induit une augmentation de la lipogenèse *de novo* en augmentant l'expression génique de SREBP-1c ainsi que sa maturation protéique (Lawler *et al.*, 1998). Il a été montré aussi qu'une augmentation de la production de TNF- $\alpha$  dans le foie induit une diminution de l'expression de PPAR- $\alpha$  induisant conséquemment une diminution de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras (Tai *et al.*, 2003).

Nous avons aussi montré que l'inhibition de l'expression de SCD1 peut constituer une thérapie intéressante pour le traitement de la stéatose hépatique alcoolique. Cependant, deux points doivent être résolus avant tout :

- 1) À quel stade l'inhibition de SCD1 est-elle plus efficace pour les patients atteints de stéatose hépatique alcoolique?

2) Les souris SCD1 déficientes souffrent de dermatites et de problèmes oculaires ce qui rend difficile l'utilisation d'inhibiteur pour le moment (Ntambi *et al.*, 2002). Comment peut-on remédier à cela?

Pour répondre à ces questions, il faudrait en premier lieu faire les mêmes analyses avec le même protocole utilisé dans le chapitre IV mais en utilisant des souris déficientes en SCD1 spécifiquement au niveau du foie. Ceci permettra de savoir si l'inhibition spécifique de SCD1 au niveau du foie est suffisante pour assurer un traitement adéquate afin d'inhiber ou prévenir contre l'installation de la stéatose hépatique alcoolique.

Par la suite, une deuxième stratégie pourrait être envisagée en utilisant un inhibiteur naturel connu de SCD1 qui est l'acide sterculique (Ortinou *et al.*, 2012). Pour cela, nous prendrons des souris C57BL/6 qui seront réparties en groupes ; un groupe dont la stéatose sera induite avant l'ajout de l'acide sterculique dans la diète, un groupe qui sera traité conjointement avec de l'éthanol et de l'acide sterculique et un dernier groupe qui sera traité avec l'acide sterculique avant l'introduction de l'alcool dans la diète. Des groupes contrôles seront présents pour chaque groupe de souris. Cette analyse permettra ainsi de cibler le moment optimal pour l'administration de l'inhibiteur de SCD1 pour la thérapie ou la prévention de la stéatose alcoolique.

En conclusion, cette thèse montre que SCD1 peut réguler l'expression et la maturation de SREBP-1c dans le foie via la production de l'oléate qui se lie directement à SREBP-1c facilitant probablement sa translocation vers le noyau afin d'activer les gènes de la lipogenèse *de novo*.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que la Seipine jouerait un rôle important dans l'homéostasie des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes. Notre étude a aussi montré que l'augmentation de l'expression et de l'activité de SCD1 contribue au dérèglement du métabolisme lipidique et à l'hypersensibilité à l'insuline

observée dans les cellules Seipine déficientes qui correspondraient aux premiers stades d'installation de la stéatose hépatique non alcoolique chez les patients atteints de BSCL2.

Finalement, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de SCD1 induit une résistance à l'installation de la stéatose hépatique alcoolique.

A la lumière de nos résultats ainsi que les précédentes données de la littérature, l'inhibition de l'expression de SCD1 pourrait constituer une cible thérapeutique de choix pour traiter ou pour prévenir l'apparition de toute forme de stéatose hépatique (alcoolique ou non alcoolique). Cette découverte est très intéressante étant donné qu'il est parfois difficile de différencier une stéatose hépatique non alcoolique d'une stéatose alcoolique et que l'homme associe dans la majorité des cas un régime riche en gras et en sucre à une augmentation consommation excessive d'alcool (poutine et bière...).



## **APPENDICE A**

### **ROLE OF LIPOGENESIS AND LIPID DESATURASES IN NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE**

Mohamed Amine Lounis , Sabri Rial , James M. Ntambi and Catherine Mounier

Springer International Publishing Switzerland 2016 143

J.M. Ntambi (ed.), Hepatic De Novo Lipogenesis and Regulation of Metabolism,

DOI 10.1007/978-3-319-25065-6\_7



## A.1 Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a clinico-pathological change characterized by the accumulation of triacylglycerol (TG) in hepatic lipid droplets (LD). NAFLD can range from a simple steatosis to Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) characterized by hepatic injury, inflammation, and eventually fibrosis. NAFLD can also be associated with insulin resistance (IR), ER stress, oxidative stress and inflammation. The cause of NAFLD is due to modification of various metabolic pathways including increased fatty acid (FA) uptake and/or reduced FA oxidation, decreased VLDL secretion and increased *de novo* lipogenesis (DNL). NAFLD is often observed in obese patients where energy is in excess and energy expenditure is low. In these conditions, most of carbohydrates are converted into TG through DNL. We aim here to present the most recent studies demonstrating the key role of DNL in NAFLD development. A special focus will be made on desaturases especially the stearoyl CoA desaturase 1, a central enzyme implicated in fatty liver disease as well as on the delta 5 and delta 6 desaturases, two enzymes involved in the synthesis of omega 3 and omega 6 fatty acids.

**Keywords :** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) • Hepatic steatosis • Insulin resistance • Lipogenesis • Lipid droplet • Stearoyl CoA desaturase 1 (SCD1) • Delta 5 desaturase • Delta 6 desaturase

## A.2 Résumé

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) est une pathologie caractérisée par une accumulation de triglycérides (TG) dans des gouttelettes lipidiques (GL) dans les cellules hépatiques. La NAFLD peut progresser d'une simple stéatose à une stéatohépatite (NASH) caractérisée par un dommage du foie, une inflammation et même une fibrose. La NAFLD est souvent associée à différents troubles métaboliques comme la résistance à l'insuline (IR), le stress du RE, le stress oxydatif et l'inflammation. La NAFLD est due à une dérégulation de différentes voies métaboliques telles qu'une augmentation de la captation des acides gras et/ou une réduction de la  $\beta$ -oxydation, une diminution de la sécrétion des VLDL et une augmentation de la lipogenèse *de novo*. La NAFLD est aussi observée chez les patients obèses qui montrent une augmentation de la consommation d'énergie et une diminution de la perte énergétique. Dans ces conditions, une grande majorité des carbohydrates sont converties en TG via la lipogenèse *de novo*.

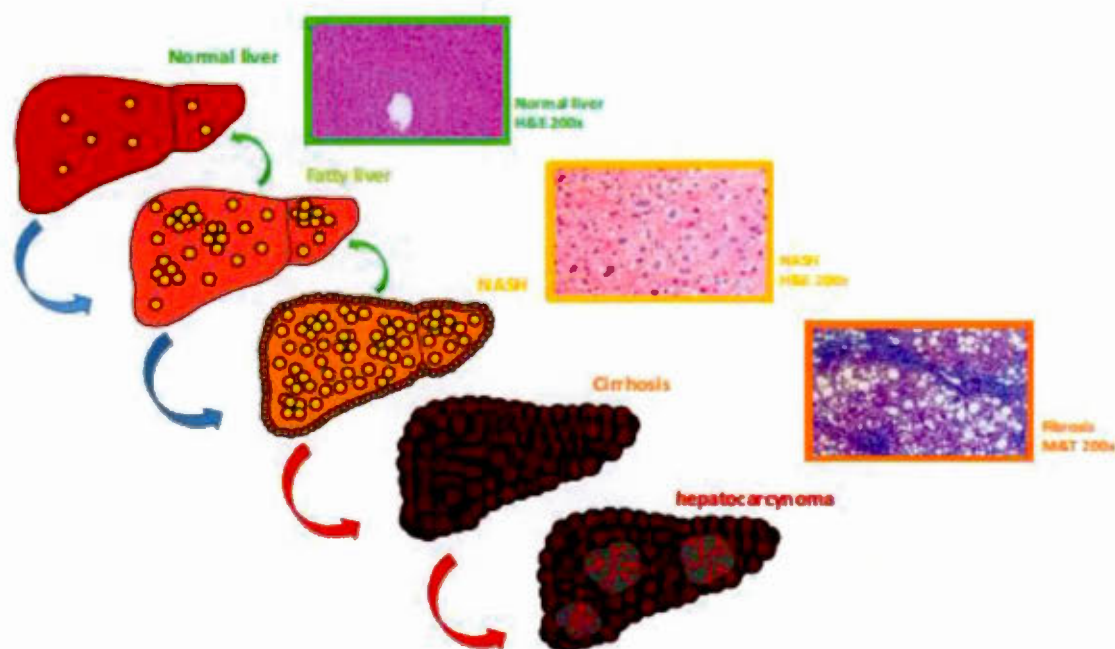
Le but de ce chapitre de livre est de présenter les études récentes montrant un rôle clé de la lipogenèse *de novo* dans le développement de la NAFLD. Nous allons nous concentrer d'avantages sur le rôle des désaturases principalement SCD1, une enzyme clé impliquée dans la stéatose hépatique ainsi que les désaturases delta-5 et delta-6, deux enzymes qui jouent un rôle dans la synthèse des acides gras polyinsaturés oméga-3 et oméga-6.

**Mots clés :** Stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) • Stéatose Hépatique • Résistance à l'insuline • Gouttelette lipidique • Stéaroyl CoA désaturases 1 (SCD1) • Delta 5 désaturase • Delta 6 désaturase

### A.3 Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Associated Pathologies

NAFLD is a major public health issue due to its high prevalence worldwide estimated to be 20–30 % of the total population (Milic et Stimac, 2012), and increasing to 57–74 % among obese patients (Angulo, 2002). It is a clinico-pathological change characterized by the accumulation of TG in hepatic LD (Teli, James, *et al.*, 1995). NAFLD is characterized by the presence of cytoplasmic LD in more than 5 % of the hepatocytes or by hepatic TG content exceeding the 95th percentile for lean and healthy who do not have any history of alcohol consumption, no viral infection or autoimmune liver disease (Cohen, J. C., Horton et Hobbs, 2011 ; Fabbrini, Sullivan et Klein, 2010 ; Stefan et Haring, 2011). TG accumulation in NAFLD is probably due to the modification of various metabolic pathways including increase in fatty acid (FA) uptake (Donnelly *et al.*, 2005), reduction in FA oxidation (Fromenty *et al.*, 2004) or VLDL secretion (Donnelly *et al.*, 2005) or finally increase in DNL (Postic et Girard, 2008). Liver histology can range the disease from simple steatosis (NAFLD) (>5 % fat infiltration, with or without minimal inflammation) to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) characterized by hepatocyte injury (ballooning degeneration in presence or not of Mallory bodies), inflammation and eventually fibrosis (Neuschwander-Tetri et Caldwell, 2003) (**Figure. A.1**). Simple steatosis is thought to be a relatively benign state, whereas NASH represents the form of NAFLD that could potentially progress to cirrhosis and the following complications such as hepatocellular carcinoma (HCC). Day and collaborators were the first to describe the “two hit hypothesis” as a model for NAFLD-progression. The “first hit” was defined as a hepatocellular lipid accumulation (steatosis) resulting from an imbalance of cellular uptake and combustion. The “second hit” was defined as an additional inflammation (NASH) resulting from an imbalance of pro- and anti-inflammatory factors (Day et James, 1998). For many years it was considered that patients with “simple” steatosis (NAFLD) show very slow or no histological progression, while NASH patients can exhibit histological and clinical progression to cirrhotic-stage

disease associated with all the known complications of liver insufficiency (Musso *et al.*, 2011). However, a recent study provides evidences that all forms of NAFLD significantly increased the risk of cirrhosis and HCC probably as the result of various allelic variants of genes involved in hepatic LD formation (Yki-Jarvinen, 2014).



**Figure A.1. Schematic representation of pathological conditions spectrum characterizing the NAFLD progression.** In comparison with a normal liver, four steps of the NAFLD progression are schematized here from simple fatty liver to hepatocarcinoma through NASH and non-alcoholic cirrhosis. The three histologic pictures from microscopic imaging are incorporated to compare normal hepatocytes with hepatocytes in fibrosis characterized by perivenular/pericellular steatosis and with NASH hepatocytes presenting ballooned morphology (Kanuri et Bergheim, 2013). NASH non-alcoholic steatohepatitis, H&E hematoxylin-Eosin stain, MT Masson-trichrome stain.



Accumulation of lipids (especially diacylglycerols (DAG) and ceramides) in liver is associated with the installation of hepatic IR (Samuel, Petersen et Shulman, 2010). The relationship between hepatic DAG accumulation and hepatic IR could be attributed to the activation of PKC $\epsilon$  (Frangioudakis *et al.*, 2009 ; Samuel *et al.*, 2004 ; Samuel *et al.*, 2007). Increased PKC $\epsilon$  directly reduced the insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate (IRS-2) by the insulin receptor kinase, leading to the reduction in insulin-stimulated hepatic glycogen synthesis and insulin-inhibition of neoglucogenesis. Supporting the key roles of PKC $\epsilon$  and DAG, hepatic knockdown expression of PKC $\epsilon$  (Samuel *et al.*, 2007) or DGAT2 (diacylglycerol acyltransferase-2) (Choi *et al.*, 2007) using antisense oligonucleotides (ASO) protects mice from hepatic IR induces by high fat diet (HFD). A role for ceramides in hepatic IR was also suggested as reduced levels of ceramides improves IR in animal models of diet induced obesity. In this study, the authors suggested that the effect of ceramides on insulin signaling is mediated by a direct interaction of these lipids with the protein kinase B (Chavez et Summers, 2012). However, a more recent study showed an opposite result. The TLR-4 knockout mice showed that despite previous evidences, the TLR-4 toll like receptor signaling is not involved in ceramides synthesis and that IR is not dependent of ceramides accumulation but on DAG implicating the activation of a PKC $\epsilon$  /IRS2-dependent signaling pathway (Galbo *et al.*, 2013). Another feature associated with NAFLD is the apparition of ER stress. The ER plays an important role in the synthesis, folding and trafficking of proteins. Accumulation of lipid in the liver induces the dysfunction of ER, causing the accumulation of unfolded proteins therein, triggering an unfolded protein response (UPR) (Puri, P. *et al.*, 2008). Recent data indicates that UPR is activated in NAFLD playing an important role in the development and the progression of the disease (Boden *et al.*, 2011 ; Feng *et al.*, 2003). Saturated fatty acids such as palmitate activate the UPR in liver characterized by a preferential induction of PERK signalling (Cao *et al.*, 2012 ; Wei *et al.*, 2006). Conversely, short-term exposure to unsaturated fatty acids attenuates ER stress in setting the excess of palmitate (Fu,



Watkins et Hotamisligil, 2012 ; Listenberger *et al.*, 2003). UPR is characterized by the arrest of protein synthesis through the phosphorylation of eIF-2 $\alpha$ , by the activation of proteosomal protein degradation and by the activation of the ATF4-CHOP-GADD34 axis. The latter allows cells to adapt to ER dysfunction. When cells fail to adapt, JNK is activated leading to inflammation and apoptosis (Kaplowitz et Ji, 2006). In both NAFLD and NASH, an increased eIF-2 $\alpha$  phosphorylation is observed. However, in NASH, the downstream recovery pathway (ATF4-CHOP-GADD34) is not activated. Consequently, JNK phosphorylation is increased. This may explain at least in part the apparition of inflammation in the NASH state (Puri, P. *et al.*, 2008). Oxidative stress is also activated in NAFLD. It is the result of a serious imbalance between limited antioxidant defenses and an excessive formation of both reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (Robertson, Leclercq et Farrell, 2001). Free fatty acids (FFA) are metabolized via the mitochondrial  $\beta$  – oxidation pathway and the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Accelerated  $\beta$  -oxidation, due to an excess of lipid in the liver as observed in NAFLD, induces an excessive electron flux in the electron transport chain of the mitochondria increasing ROS production and leading to mitochondrial dysfunction (Rolo, Teodoro et Palmeira, 2012). NASH is also characterized by an elevated hepatic DNL resulting in an increased production of malonyl-CoA. In turn, malonyl-CoA inhibits the carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) leading to a decrease of long chain fatty acids import into the mitochondria, and consequently a reduction in  $\beta$ -oxidation. Consequently, TG accumulates in the liver aggravating the steatosis (Rolo, Teodoro et Palmeira, 2012 ; Vega, Huss et Kelly, 2000). The severity of NAFLD correlates with the expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) receptor while the production of TNF $\alpha$  is dependent on FA concentration (Crespo *et al.*, 2001). In addition, activation of the TNF receptor increases the expression of SREBP1c, inducing hepatic DNL and lipid accumulation (Endo *et al.*, 2007). In ob/ob mice, secretion of TNF $\alpha$  and IL6 activates the hepatic Kupffer cells promoting hepatotoxicity, IR and steatohepatitis (Li, Z. et Diehl, 2003 ; Odegaard *et al.*, 2008).

#### A.4 Characteristics of the Hepatic Lipid Droplets

NAFLD is characterized by the presence of LD in hepatocytes. LD are dynamic cellular organelles found in most cells and particularly in cells specialized in lipids storage such as white and brown adipose tissue, hepatocytes and enterocytes. LD cores contain neutral lipids predominantly TG or sterol esters. These organelles may also include retinyl esters, waxes and ether lipids (Brasaemle et Wolins, 2012 ; Farese et Walther, 2009 ; Martin et Parton, 2006). These lipids are surrounded by a phospholipid monolayer coated with a large number of proteins. They regulate many aspects of LD biology including the synthesis and the mobilization of lipids as well as their interaction with other cellular organelles. LD could either be formed *de novo* or derived from existing LD by fusion (Long *et al.*, 2012). *De novo* formation of LD in eukaryotes occurs from the ER (Jacquier *et al.*, 2011 ; Jacquier *et al.*, 2013) where neutral lipids are synthesized (Buhman, Chen et Farese, 2001).

The precise mechanism of LD formation remains however mostly unanswered. The most widely accepted model proposed for LD biogenesis lasts in three different steps (Wilfling *et al.*, 2014) (**Figure. A.2**).

(a) Neutral lipids are synthesized in the ER and accumulate within the bilayer. Neutral lipids are highly mobile in the bilayer and may spontaneously aggregate on the basis of their thermal fluctuations and interactions with membrane proteins or other lipids.

(b) Once the local concentration of neutral lipid reaches a crucial threshold, an intra-membrane lipid accumulation occurs leading to the formation of lens.

(c) As lens accumulates additional neutral lipids, the bilayer deforms and a nascent LD buds into the cytoplasm. The nascent droplet might remain attached to the ER or separate completely. LD can growth by two general mechanisms: LD expansion or LD fusion (Wilfling *et al.*, 2014). The expansion is triggered by the relocalization of

TG synthesis enzymes from the ER to the surface of LD (Beller *et al.*, 2010 ; Wilfling *et al.*, 2014). When phosphatidylcholine is limited and the tension at the surface is relatively high, large LD can be formed by fusion/coalescence of two or more LD (Beller *et al.*, 2010 ; Wilfling *et al.*, 2014). During steatogenesis, the expression pattern of several LD associated proteins (proteins belonging to the perilipins family) changes. This is probably associated with the increased expression of PPAR $\gamma$ , a transcription factor that targets several genes implicated in LD formation (Inoue *et al.*, 2005 ; Matsusue *et al.*, 2008). Notably, perilipin 1, only expressed in adipose tissue in normal condition is also expressed in fatty liver (Fujii *et al.*, 2009 ; Straub *et al.*, 2008). ADRP levels are also elevated in fatty liver (Motomura *et al.*, 2006). High expression of hepatic lipase (Yamada *et al.*, 2015) and lysophospholipase-like1 (Speliotes *et al.*, 2011), two enzymes with TG lipase activity, as well as DGAT2, an enzyme involved in TG synthesis (Kantartzis *et al.*, 2009), have been associated with the risk of developing hepatic steatosis. Interestingly, several studies showed that genetic variations of genes implicated in hepatic lipid accumulation and in LD such as ATGL and CGI58, are not associated with IR (Cohen, J. C., Horton et Hobbs, 2011 ; Hooper, Adams et Burnett, 2011). This is consistent with the hypothesis that the sequestration of lipids into hepatic LD protects the liver from free fatty acid induced lipotoxicity that promotes IR.

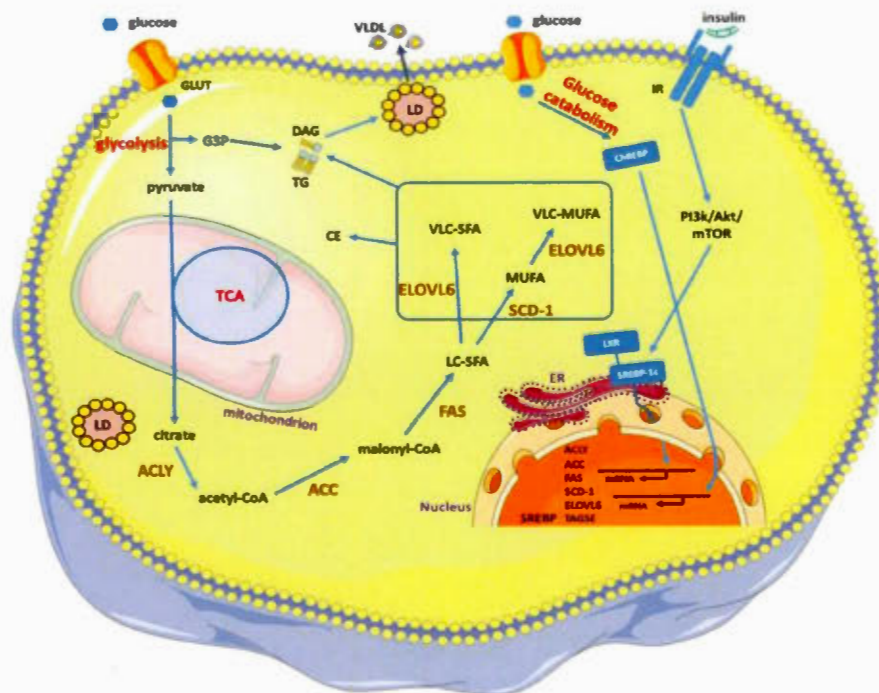
**Figure A.2. The lensing model of lipids droplets (LD) biogenesis.** This schematic representation depicts the three steps of the “lensing” model, the most widely accepted model for LD biogenesis. (a) Newly synthesized FFA are acetylated by ACBP and esterified by DAG and TG synthesis enzymes. (b) LPA, PA, DAG and TG accumulate within the phospholipidic bilayer inducing a membrane lensing in the cytosolic surface of the ER. (c) Formation of a prolonged lensing induces a sufficient bilayer deformation allowing the nascent of LD. The LD can separate completely, fuse together or remain attached to the ER. Associated proteins such as PLIN ensure the stabilization of the LD (Guo *et al.*, 2009 ; Kohlwein, Veenhuis et van der Klei, 2013). DNL *de novo* lipogenesis, FFA free fatty acids, ACBP acetyl-CoA binding protein, GPAT glycerol-3-phosphate acyltransferase, AGPAT 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase, PAP phosphatidic acid phosphohydrolase, DGAT diacylglycerol acyltransferase, LPA lysophosphatidic acid, PA phosphatidic acid, DAG diacylglycerol, TG triacylglycerol, PLIN perilipin.



### A.5 Role of Lipogenesis in NAFLD

Numerous studies have implicated DNL in the development of NAFLD. DNL consists in the conversion of carbohydrates into lipids. These newly synthesized lipids are essentially esterified into TG and then either shipped via the very low density lipoproteins (VLDL) to the peripheral tissues including lipid-storing tissues like muscles and adipose tissues or accumulated in LD (Rui, 2014 ; Strable et Ntambi, 2010). The classical DNL pathway is widely documented and can be summarized as follow (**Figure.A.3**). In pro-lipogenic conditions, blood glucose is internalized and pyruvate is produced by the glycolysis. The pyruvate is converted into acetyl-CoA by the ATPcitrate lyase (Ameer *et al.*, 2014 ; Rui, 2014) and converted in malonyl-CoA by the acetyl-CoA carboxylase (ACC). The malonyl-CoA is in turn converted into palmitate (C16:0) by the fatty acid synthase (FAS) from the malonyl and acetyl-CoA (Lodhi, Wei et Semenkovich, 2011 ; Rui, 2014 ; Strable et Ntambi, 2010). Subsequently, the palmitate can be modified by elongation, desaturation or esterification. Elongation is mainly catalyzed by the ELOVL6 enzyme (Strable et Ntambi, 2010). The substrates of ELOVL6 also include saturated and monounsaturated fatty acids from the DNL or from the diet (Kessler *et al.*, 2014 ; Matsuzaka et Shimano, 2011 ; Moon *et al.*, 2001). The stearoyl CoA desaturase 1 (SCD1) is responsible for the  $\Delta$ -9 desaturation of fatty acids produced by DNL and coming from the diet generating the palmitoleate (C16:1n-9) and oleate (C18:1n-9). The monounsaturated fatty acids (MUFA) are then preferentially mobilized for the formation of phospholipids, cholesteryl esters and TG (Mauvoisin et Mounier, 2011 ; Strable et Ntambi, 2010). These syntheses occur in the ER involving GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase), PAP (phosphatidic acid phosphohydrolase) and DGAT (diacylglycerol acyltransferase) (Coleman et Mashek, 2011 ; Nye, Hanson et Kalhan, 2008). DNL is considered a great contributor to NAFLD and obesity progression. Patients with NAFLD present a 30 % increase in hepatic TG derived from DNL while 60 % came from the circulating FFA (NEFA) and less than 10 %





**Figure A.3. De novo lipogenesis pathway.** This schematic representation depicts the lipogenic process and its positive regulators from the glucose absorption to the fatty acids and cholesterol esters production. Insulin and glucose are represented as the two main activators of the process. Insulin activates the PI3k/Akt/mTOR pathway leading to the cleavage of SREBP while glucose serves as a lipogenic precursor and an activator for ChREBP and LXR (Kersten, 2001 ; Strable et Ntambi, 2010).

The DNL pathway is highly regulated in response to body needs. Nutrients and hormones are the major regulators of this pathway. The expressions of the key lipogenic genes expression are mainly regulated at the transcriptional level by LXR (liver X receptor), RXR (retinoid X receptor), SREBP (Sterol regulatory element binding protein) and ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein) transcription factors (Strable et Ntambi, 2010). Many studies based on “OMIC” approaches as well as studies using human subject or engineered animals revealed that more than the rate of hepatic DNL is the type of stored FA associated with NAFLD progression, suggesting the implication of the specific genes involved in the DNL pathway. Patients diagnosed with NAFLD have more hepatic endogenous C12:0 to C22:0 lipids (monounsaturated and polyunsaturated) than control patients. In NASH patients, the C18:0/C16:0 ratio is increased and strongly associated with steatosis. This suggests an important role for ELOVL6 in the progression of fatty liver diseases. In parallel, transcriptional expression levels of SCD-1, ELOVL6, SREBP-1C, FAS, and PPAR $\gamma$  were markedly enhanced in NASH group compared to simple steatosis but less associated with the different histological manifestations scores of NAFLD (Yamada *et al.*, 2015). Elov16  $-/-$  mice are protected from atherogenic HFD-induced liver injuries, inflammation, oxidative stress, fibrosis and NASH progression, while transgenic mice overexpressing human ELOVL6 showed an opposite phenotype (Matsuzaka *et al.*, 2012). In the same study, examination of NASH-human biopsy samples showed a correlation between ELOVL6 expression and liver injury. The authors suggest that ELOVL6 mediates its effect on NASH by promoting the palmitate-induced activation of the NLR family pyrin domain-containing 3 inflammasome. At the opposite, another Elov16  $-/-$  mice model accumulated significantly more hepatic TG than control mice under fat-free/high carbohydrate diet and HFD. In these conditions, the Elov16  $-/-$  mice are not protected against obesity, fatty liver and IR (Moon *et al.*, 2014). The authors also showed that abolishing Elov16 expression in ob/ob mice does not change their phenotype. However, these mice produced more C18:1n7 than controls, suggesting the presence

of an ELOVL6 alternative pathway to generate stearic acid. Therefore, the precise role for ELOVL6 in NAFLD and NASH development remains to be determined. Other lipogenic genes can predispose to NAFLD, namely ACC, FAS and SCD-1 as well as the associated transcription factors SREBP-1c, LXR and ChREBP. Recently, a study showed that hepatic human biopsies obtained from patients with NAFLD showed a significant decreased expression of sirtuins (SIRT) proteins compared to control patients. This is associated with a higher expression of ACC, FAS and SREBP-1c (Wu, T. *et al.*, 2014). Interestingly it was previously demonstrated that SIRT proteins have an anti-NAFLD potential by reducing the expression of lipogenic genes (Yamazaki *et al.*, 2009). Deletion of ACC1 in mice is lethal while ACC2  $-/-$  mice are leaner mice and resistant to HFD-induced obesity and IR. These mice present a lower level of hepatic mitochondrial malonyl-CoA leading to activation of CPT1 and subsequently to  $\beta$  -oxidation (Abu-Elheiga *et al.*, 2003 ; Postic et Girard, 2008). In fact, NASH is characterized by an elevated concentration of malonyl-CoA probably due to an increased activity of ACC. In turn, malonyl-CoA inhibits the carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) leading to a decrease of long chain fatty acids import into the mitochondria, and consequently a reduction in  $\beta$  -oxidation. Consequently, TG accumulate in the liver aggravating the steatosis (Rolo, Teodoro et Palmeira, 2012 ; Vega, Huss et Kelly, 2000). Liver specific ACC1 KO mice (LACC1 KO) do not present any health problem under normal diet. However, the decreased contents of hepatic malonyl-CoA and TG are associated with a lower lipogenic yield (twofold) (Mao *et al.*, 2006). Unexpectedly, these mice fed with HFD showed an up-regulation of both FAS and PPAR $\gamma$  but this is still associated with a decrease in DNL and hepatic TG (Mao *et al.*, 2006). In another LACC1 KO mice model, Kohjima and collaborators showed that hepatic deletion of ACC1 activates both expression and activity of the ACC2. This compensatory phenomenon was associated with a null impact on DNL capacity compared to control animals. The authors conclude that silencing both isoforms of ACC is necessary to clearly establish a role for this enzyme in NAFLD (Postic et Girard, 2008). Given its central role in the DNL



process, FAS is an ideal target to prevent the NAFLD progression but also the progression of a large spectrum of other metabolic diseases such as obesity, diabetes, hepatocarcinoma, and cardiovascular complications (Berlango *et al.*, 2014). Studies performed on human NAFLD biopsies (Kohjima *et al.*, 2007 ; Yamada *et al.*, 2015), on human primary hepatocytes exposed to palmitic acid as well as on murine models of steatohepatitis (Dorn *et al.*, 2010) revealed a marked elevation in FAS expression associated with NAFLD or NAFLD-like conditions. Unexpectedly, liver-specific FASKO mice developed fatty liver and hypoglycemia under a zero-fat diet and this was reversed by addition of dietary fat. A similar observation was made under fasting. This was corrected by addition of PPAR $\alpha$  agonist suggesting that FAS is responsible for the synthesis of PPAR $\alpha$  ligands (Chakravarthy *et al.*, 2005). Indeed, silencing FAS expression results in a decrease of *de novo* synthesized LCFA known to be the activating-ligands of PPAR $\alpha$  (Chakravarthy *et al.*, 2005 ; Postic et Girard, 2008). Therefore, through the activation of PPAR $\alpha$ , FAS can induce  $\beta$ -oxidation decreasing TG accumulation in the liver. However, silencing FAS gene expression could also lead to accumulation of malonyl-CoA, inhibiting CPT1 activity and consequently decreasing  $\beta$ -oxidation. This latter pathway seems to be predominant as most of the published data confirms the relevance of modulating FAS expression to prevent NAFLD progression.

Several reports also demonstrated a marked elevation in hepatic LXR expression associated with NAFLD (Berlango *et al.*, 2014 ; Ducheix *et al.*, 2013 ; Higuchi *et al.*, 2008). Immunostaining of hepatic human biopsies revealed that the rate of positive LXR $\alpha$  expression was 30 % in healthy people, 50 % in NAFLD patients, and 97 % in NASH. LXR $\alpha$  expression was also positively associated with SREBP-1c expression as well as with inflammation, hepatic fibrosis progression and elevated expression of genes involved in fatty acid uptake (Ahn *et al.*, 2014). In agreement with this study, Higuchi and collaborators showed that in hepatic biopsies of NAFLD patients, overexpression of LXR is correlated with higher expression of SREBP-1c (Higuchi *et*

*al.*, 2008). Treatment of diet-induced NAFLD mice with SR9238, a selective LXR $\alpha$  / $\beta$  inhibitor, abrogated hepatic DNL, lowered inflammation progression and hepatic lipids accumulation. In these conditions, no hepatic damage was observed (Griffett *et al.*, 2013). In another study Sim and collaborators showed that treating mice fed with a HFD with the LXR $\alpha$  antagonist MDGA (meso-dihydroguaiaretic) decreases hepatic lipid accumulation. This is directly correlated with a marked drop in lipogenic genes expression (Sim *et al.*, 2014). Silencing SREBP-1c in ob/ob mice in both liver and adipose tissues is associated with a mark reduction in fatty liver progression, while obesity and IR remained unchanged. This correlated with a reduction in hepatic TG content and a lower expression of lipogenic genes. This suggests an implication of SREBP-1c in fatty liver (and maybe in NAFLD) but not in obesity (Yahagi *et al.*, 2002). However, the knockout in both liver and adipose tissue may influence the data and a specific hepatic knockout may clarify the implication of SREBP-1c in obesity and IR progression. Interestingly, it was recently showed that Dec1 (differentiated embryo chondrocyte expressed gene 1), a negative regulator of SREBP-1c expression, is under expressed in NAFLD while its overexpression led to a significant drop in SREBP-1c and other lipogenic genes such as FAS and ACC decreasing accumulation of hepatic TG (Shen *et al.*, 2014). Another study showed that comparing healthy, simple steatosis and NASH patients does not revealed any significant difference in fatty acid uptake, hepatic lipid oxidation and VLDL secretion. However, NASH patients show a lower hepatic SREBP-1c and lipogenic genes expressions (Nagaya *et al.*, 2010). This suggests that down-regulation of SREBP-1c and lipogenic enzymes are characteristics of a fibrosis state probably mediated by a higher level of TNF $\alpha$ . Therefore, expressions of lipogenic enzymes must be specific for each step of the NAFLD progression spectrum. Recently, a potential role of SREBP-1a in NAFLD was also suggested as SREBP-1a knock-down induced a significant drop in SREBP-1c expression associated with a radical decrease in the expression level of all lipogenic genes (Bitter *et al.*, 2015). While LXR $\alpha$ , SREBP-1c and lipogenic genes were upregulated in NAFLD diagnosed patients, ChREBP



expression is not modify (Higuchi *et al.*, 2008). However patients with NASH show higher ChREBP expression when steatosis was upper than 50 % and lowered if IR was present (Benhamed *et al.*, 2012). In the same study, it was showed that mice fed with HFD showed elevated expression of ChREBP that can dissociate hepatic steatosis to the IR ameliorating lipid metabolism and glucose metabolism. However, liver-specific inhibition of ChREBP in ob/ob mice led to decrease plasma TG and NEFA levels improving steatohepatitis. This is associated with elevated lipogenic rate and enhanced insulin sensitivity in liver, skeletal muscles and white adipose tissue (Dentin *et al.*, 2006). Taken together, the studies reveal that elevated DNL is associated with increased hepatic TG and NAFLD development. This is probably the result of increased SREBP-1c expression. However, the progression of the disease leading to NASH seems to be associated with a lower DNL probably through the activation of TNF $\alpha$  secretion inhibiting SREBP-1c. However, even if a general role of the DNL is established, a role of each individual enzyme remains to be precisely defined due to presence of compensatory mechanisms.

#### **A.6 Role of Delta 5 ( $\Delta$ 5) and Delta 6 ( $\Delta$ 6) Desaturases in NAFLD**

Livers of obese patients with NAFLD show depletion in the concentration of long chain poly-unsaturated fatty acids (LCPUFA) especially the n-3 and n-6 series of TG (Araya *et al.*, 2010 ; Araya *et al.*, 2004). In particular, a strong decrease of arachidonic acid (AA; 20:4, n-6), eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5, n-3) and docosahexaenoic acid (DHA; 22:6, n3) was observed in hepatic steatosis and steatohepatitis (Araya *et al.*, 2004). Depletion of such fatty acids may be responsible for the progression of the disease leading to cirrhosis (Gormaz *et al.*, 2010). Modification in the availability of LCPUFA has also been associated with numerous other metabolic pathologies often associated with NAFLD such as cardio-vascular diseases, obesity, type II diabetes and metabolic syndrome (Gormaz *et al.*, 2010).

LCPUFA are formed by series of desaturations and elongations.  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  desaturases are the key desaturases in this process catalyzing the synthesis of n-3 and n-6 LCPUFA (Vessby *et al.*, 2002). The 18:2(n-6) and 18:3(n-3) are desaturated by the  $\Delta 6$  desaturase to form the 18:3(n-6) and 18:4(n-3) while the  $\Delta 5$  desaturase will form the AA, EPA and DHA. In this process, the  $\Delta 6$  desaturase is the rate-limiting enzyme (Lenihan-Geels, Bishop et Ferguson, 2013). If the role of SCD1 in the development of NASH has been clearly established, the roles of the  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  desaturases appear more complex. In a study published in 2005, Tovar and collaborators showed that feeding hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats with Soy protein decreases liver steatosis and lipotoxicity. This is associated with a potent inhibition of both  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  mRNA levels (40 % and 69% respectively) (Tovar *et al.*, 2005). However liver of mice fed with methionine and choline deficient diet (MCD), a nutritional model of steatohepatitis displays a significant increase in  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  desaturases mRNA (Larter *et al.*, 2008). In these studies, the type of hepatic LCPUFA was not evaluated. Recently, a study performed in liver biopsies of NASH patients showed a clear increased in both  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  desaturases mRNA expression. This was associated with an impaired desaturation of  $\omega 3$  and  $\omega 6$  fatty acids, with an increase in the  $\omega 6:\omega 3$  ratio and a reduction in the  $\omega 3$  desaturation index (Lopez-Vicario *et al.*, 2014). Several other studies performed in obese NAFLD patients also revealed a decrease in  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  desaturases activities and an increase in the  $\omega 6:\omega 3$  ratio (Araya *et al.*, 2010 ; Araya *et al.*, 2004 ; Kotronen *et al.*, 2009). Interestingly, it was recently showed that the decrease in  $\Delta 6$  desaturase expression is associated with an up regulation of miR-140, and miR2885, two miRNA previously associated with hepatic disorders and NAFLD (Fatima *et al.*, 2014). The molecular mechanisms of LCPUFA depletion on NAFLD development can be explained by the effect of these fatty acids on the transcription factors involved in lipogenesis and  $\beta$ -oxidation (Pettinelli *et al.*, 2009). LCPUFA inhibits the expression of both ChREBP (Dentin *et al.*, 2005) and SREBP-1c (Hannah *et al.*, 2001), two transcription factors known to activate lipogenic genes expression in response to sugar and insulin respectively. At

the opposite, LCPUFA activate PPAR $\alpha$  promoting  $\beta$ -oxidation (Nakamura et Nara, 2004). At the difference of the previous published reports, a study performed in 1100 non-obese elderly men showed that an increased in  $\Delta$  6 desaturase index is positively associated with the plasmatic concentration of alanine aminotransferase (ALT), a marker of liver injury. Even if in this study, the authors did not directly measured the presence of lipid in the liver, they observed a positive correlation between plasmatic fatty acid composition known to be associated with fat liver, and  $\Delta$  6 desaturase activity (Petersson *et al.*, 2010). The authors explained the differences between their observations and those made by the other groups by the fact that their study was performed in non-obese elderly men (BMI: 26.3  $\pm$  3.4) compared to the other studies performed with severely obese subject (BMI around 50) (Araya *et al.*, 2010 ; Araya *et al.*, 2004 ; Kotronen *et al.*, 2009). According to the authors, the decrease in  $\Delta$  6 desaturase activity observed by the other studies may be a consequence of long term obesity and hyperinsulinemia. They also argue that the low number of patients in the other studies (10 in average vs. 1100 subjects in the present study) may also influence the results observed by other groups. Finally, the authors mentioned that their study was performed on Swedish patients while most of the other studies were performed on patients from Chile (Araya *et al.*, 2010 ; Araya *et al.*, 2004). According to them, the differences observed may be the result of different genetic background and dietary habits. However, a study performed with Finn patients that have probably similar life style habits than patients from Sweden, also showed a decrease in the  $\omega$ 6: $\omega$ 3 ratio (Kotronen *et al.*, 2009). Despite the differences observed in the latest described study, a consensus seems to emerge at least in obese patients, on an increase in the  $\omega$  6: $\omega$ 3 ratio associated with the development of NAFLD and the metabolic disorders. This prompts the researchers to propose a dietary  $\omega$ 3 supplementation to reduce the hepatic TG content and the associated liver injury (Capanni *et al.*, 2006 ; Spadaro *et al.*, 2008). However, a recently published trial performed on 103 obese patients treated with EPA and DHA for 15–18 months showed a decrease in fat liver content but no effect on liver fibrosis biomarker scores.

At the opposite, a study performed in children shows that DHA supplementation improved liver steatosis and insulin sensitivity (Nobili *et al.*, 2013) while lack of  $\omega 3$  consumption increase lobular inflammation (St-Jules *et al.*, 2013). Taken together, in obese patients with NAFLD, LCPUFA are depleted and the  $\omega 6:\omega 3$  ratio elevated. This results in hepatic AA accumulation, activation of DNL and inhibition of  $\beta$ -oxidation. This increase in the  $\omega 6:\omega 3$  ratio probably further aggravates the hepatic pathology increasing the inflammation and the fatty acid deposit. This could be ameliorated by  $\omega 3$  supplementation however the time and dose for the treatment may be adjusted. Difference in patients should also be taken in consideration.

#### **A.7 Role of the Stearoyl CoA Desaturase 1 in NAFLD**

Numerous studies have associated an elevated stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) activity with the pathophysiology of fatty liver disease in both mice and humans. SCD1, also known as fatty acid desaturase or  $\Delta 9$ -desaturase, is a microsomal enzyme involved in the biosynthesis of monounsaturated fatty acids (MUFA), primarily oleate (C18:1) and palmitoleate (C16:1). These MUFA are the major substrates for the synthesis of complex lipids such as DAG, phospholipids, TG, wax esters, and cholesterol esters (Mauvoisin et Mounier, 2011 ; Nakamura et Nara, 2004 ; Sampath et Ntambi, 2006). SCD1 is now considered as one of the major enzymes in the control of lipid metabolism (Flowers et Ntambi, 2008). Mice with naturally occurring SCD1 null mutations and those with global deletion (SCD1  $-/-$ ) display a hyper metabolic phenotype that protects the animal from obesity, IR and hepatic steatosis under high-carbohydrate diet or HFD (Flowers et Ntambi, 2008 ; Miyazaki, Dobrzyn, Man, *et al.*, 2004 ; Miyazaki, Kim et Ntambi, 2001 ; Ntambi *et al.*, 2002). The SCD1  $-/-$  mice also display reduced hepatic TG and cholesterol esters. This is associated with upregulation of the carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1), the rate limiting enzyme of lipid  $\beta$ -oxydation while the genes encoding for the enzymes implicated in



lipid synthesis (FAS and glycerol phosphate acyl-CoA transferase (GPAT)) are reduced (Ntambi *et al.*, 2002). Liver specific SCD1 knockout mice (LKO mice) are also protected from carbohydrate but not from HFD-induced hepatic steatosis (Miyazaki *et al.*, 2007). Elevated hepatic SCD1 expression appears therefore associated with carbohydrate-induced hepatic steatosis while an extra-hepatic expression seems necessary to promote HFD-induced steatosis. However, mice intraperitoneally injected with SCD1 targeted antisense oligonucleotide (ASO) are protected from development of NAFLD under HFD (Brown *et al.*, 2008). The discrepancy between the two studies can be explained by the fact that ASO-injected mice showed inhibition of SCD1 expression both in liver and adipose tissue while in LKO mice SCD1 is only inhibited in liver (Flowers et Ntambi, 2008). In addition, LKO mice display reduced nuclear content of ChREBP and SREBP-1c, two key transcription factors regulating the expression of lipogenic genes in response to glucose and insulin respectively. The exact mechanism by which SCD1 affects the maturation or the translocation of these two transcriptional factors remains to be identified. A possible explanation could be that decreased in oleate concentration in LKO mice is responsible for the inhibition of ChREBP and SREBP-1c expressions as oleate supplementation normalized their levels (Miyazaki *et al.*, 2007). In human studies, the role of SCD1 in hepatic fat metabolism has been mainly evaluated by the measure of the both hepatic (Kotronen *et al.*, 2009 ; Silbernagel *et al.*, 2012) and plasmatic (Lee, J. J. *et al.*, 2015 ; Petersson *et al.*, 2010 ; Stefan *et al.*, 2008) 18:1 n-9/18:0 ratio referred as the desaturase index. The hepatic desaturase index in total lipids from individuals with or without NAFLD was found to be positively correlated with the percentage of hepatic fat (Kotronen *et al.*, 2009). In this latter study, the authors state that fatty liver is characterized by an increase in hepatic SCD1 activity. In contrast to this data, another study showed that the desaturase index in VLDL-TG was negatively correlated with the hepatic fat content particularly in obese patients while no apparent correlation was observed in lean patients (Stefan *et al.*, 2008). The authors suggested that the liver specific down regulation of SCD1 may impair VLDL



assembly and subsequently may reduce the capacity for the liver to clear intra-hepatic TG. The authors stated that the differences between their observations and those made in mice could be explained by the fact that SCD1  $-/-$  mice present a lean and not an obese phenotype. In addition, the desaturation index in VLDL-TG can reflect both hepatic and fat SCD1 desaturation indexes while most of the studies performed in mice have directly measured the hepatic SCD1 index. At the opposite, Peters and collaborators showed that in 50 non-obese Caucasians, the SCD1 index correlates with the hepatic TG content while no correlation was observed with the PL fraction. Interestingly, in the same study, the authors did not find any correlation with the hepatic SCD1 mRNA level showing the importance of measuring specific FA fraction to evaluate SCD1 activity (Peter *et al.*, 2011). In another study also performed in non-obese healthy patients, the basal SCD1 activity index does not appeared to correlate with the hepatic fat content (Silbernagel *et al.*, 2012). The authors also showed that addition of a sugar-enriched lipogenic diet increases the hepatic fat content that is negatively correlated with the hepatic SCD1 activity (Silbernagel *et al.*, 2012). The authors suggest that SCD1 may protect from the adverse effects of a lipogenic enriched sugar diet. Interestingly, the authors proposed the hypothesis that low hepatic SCD1 activity observed in sugar-enriched lipogenic diet, can be the consequence of long-chain saturated fatty acids accumulation such as palmitate, leading to ER stress (Cao *et al.*, 2012). This in turn inhibits VLDL secretion leading to hepatic TG accumulation and steatosis (Caviglia *et al.*, 2011). Adding to the complexity, a recent study showed that in obese patients, the 16:1 n-7/16:0 desaturation index correlates with the hepatic fat content but not with the 18:1 n-9/18:0 index (Lee, J. J. *et al.*, 2015). Finally, Li and collaborators investigated the role of hepatic SCD1 in the prevention of hepatic inflammation, apoptosis and fibrosis in a model of steatosis using both in vitro (murine and human hepatocytes) and in vivo models (Li, Z. Z. *et al.*, 2009). Their findings suggest that up-regulation of hepatic SCD1 is a crucial adaptive mechanism in the prevention of liver damage and hepatitis by decreasing the amount of SFA in hepatocytes. Taken together, all

this evidences point for a central role of SCD1 in the pathogenesis of NAFLD. SCD1 activity is indeed necessary for the generation of hepatic TG, the main lipids stored in LD, generating the initial step of steatosis. However the association between the hepatic level of SCD1 activity and the TG content appears to depend on several conditions such as the presence or not of obesity (low or high FA flux), the site of SCD1 expression (liver vs. adipose tissue), the type of fatty acids examined (C16 vs. C18) and finally the type of diet used in the studies. At the opposite, a consensus emerged that high SCD1 activity may protect liver from lipotoxicity by decreasing the pool of hepatic SFA and increasing of the pool of MUFA.

#### **A.8 Conclusion**

NAFLD is characterized by the accumulation of TG in hepatic LD. The disease can range from a simple steatosis to a NASH characterized by the apparition of hepatic injury, inflammation, and eventually fi brosis. To date evidences point for a central role of hepatic DNL in the establishment of NAFLD especially in the case of energy excess as observed in obesity. In these conditions, a large part of hepatic TG comes from DNL. This is associated with an elevated expression of the lipogenic enzymes and the associated transcription factor SREBP-1c. However, when the disease progress,  $\text{TNF}\alpha$  concentration raises leading to increased inflammation. Consequently,  $\text{TNF}\alpha$  down-regulates SREBP-1c expression leading to transcriptional inhibition of the lipogenic genes. FAS is also responsible for the synthesis of LCFA. These fatty acids are the direct activators of  $\text{PPAR}\alpha$  activating  $\beta$ -oxidation while high SCD1 activity decreases the pool of LCFA such as palmitate, a fatty acid inducing inflammation. Therefore, apparition of NASH associated with elevated  $\text{TNF}\alpha$  will inhibit FAS and SCD1 activities aggravating the disease by decreasing  $\beta$ -oxidation and increasing palmitate concentration. Taken together, activation of DNL appears implicated in the establishment of NAFLD while DNL inhibition will be more

associated with the progression of the disease and the apparition of NASH. Finally, the roles of  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  desaturases appear more controversial. However, a consensus seems to be established that in obese patients, the  $\omega 6:\omega 3$  ratio raises associated with an elevated concentration of AA, a  $\omega 6$  FA implicated in the development of inflammation. Consequently, the NAFLD progresses in NASH and eventually in cirrhosis.

In conclusion, treatment of NAFLD could be achieved by inhibition of DNL while for NASH, a decrease in the  $\omega 6:\omega 3$  ratio could be a better target that can be achieved by  $\omega 3$  supplementation.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Elheiga, L., Oh, W., Kordari, P. et Wakil, S.J. (2003). Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(18), 10207-10212.
- Agarwal, A.K. et Garg, A. (2003). Congenital generalized lipodystrophy: significance of triglyceride biosynthetic pathways. *Trends Endocrinol Metab*, 14(5), 214-221.
- Agarwal, A.K. et Garg, A. (2004). Seipin: a mysterious protein. *Trends Mol Med*, 10(9), 440-444.
- Ahn, S.B., Jang, K., Jun, D.W., Lee, B.H. et Shin, K.J. (2014). Expression of liver X receptor correlates with intrahepatic inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*, 59(12), 2975-2982.
- Aller, R., De Luis, D.A., Izaola, O., Conde, R., Gonzalez Sagrado, M., Primo, D., De La Fuente, B. et Gonzalez, J. (2011). Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 15(9), 1090-1095.
- Amacher, D.E. et Chalasani, N. (2014). Drug-induced hepatic steatosis. *Semin Liver Dis*, 34(2), 205-214.
- Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H. et Zaidi, N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, 63(7), 895-902.
- Angulo, P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*, 346(16), 1221-1231.
- Anstee, Q.M. et Goldin, R.D. (2006). Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol*, 87(1), 1-16.
- Araki, K. et Nagata, K. (2011). Functional in vitro analysis of the ERO1 protein and protein-disulfide isomerase pathway. *J Biol Chem*, 286(37), 32705-32712.
- Araujo, J.R. et Martel, F. (2012). Sibutramine effects on central mechanisms regulating energy homeostasis. *Curr Neuropharmacol*, 10(1), 49-52.

- Araya, J., Rodrigo, R., Pettinelli, P., Araya, A.V., Poniachik, J. et Videla, L.A. (2010). Decreased liver fatty acid delta-6 and delta-5 desaturase activity in obese patients. *Obesity* (Silver Spring), 18(7), 1460-1463.
- Araya, J., Rodrigo, R., Videla, L.A., Thielemann, L., Orellana, M., Pettinelli, P. et Poniachik, J. (2004). Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)*, 106(6), 635-643.
- Arisawa, K., Ichi, I., Yasukawa, Y., Sone, Y. et Fujiwara, Y. (2013). Changes in the phospholipid fatty acid composition of the lipid droplet during the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biochem*, 154(3), 281-289.
- Ariyama, H., Kono, N., Matsuda, S., Inoue, T. et Arai, H. (2010). Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J Biol Chem*, 285(29), 22027-22035.
- Attie, A.D., Krauss, R.M., Gray-Keller, M.P., Brownlie, A., Miyazaki, M., Kastelein, J.J., Lusis, A.J., Stalenhoef, A.F., Stoeckl, J.P., Hayden, M.R. et Ntambi, J.M. (2002). Relationship between stearoyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia. *J Lipid Res*, 43(11), 1899-1907.
- Bakan, I. et Laplante, M. (2012). Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation. *Curr Opin Lipidol*, 23(3), 226-234.
- Banerjee, A., Meyer, K., Mazumdar, B., Ray, R.B. et Ray, R. (2010). Hepatitis C virus differentially modulates activation of forkhead transcription factors and insulin-induced metabolic gene expression. *J Virol*, 84(12), 5936-5946.
- Baranowski, M. (2008). Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol*, 59 Suppl 7, 31-55.
- Bellentani, S., Saccoccio, G., Masutti, F., Croce, L.S., Brandi, G., Sasso, F., Cristanini, G. et Tiribelli, C. (2000). Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med*, 132(2), 112-117.
- Beller, M., Bulankina, A.V., Hsiao, H.H., Urlaub, H., Jackle, H. et Kuhnlein, R.P. (2010). PERILIPIN-dependent control of lipid droplet structure and fat storage in *Drosophila*. *Cell Metab*, 12(5), 521-532.
- Beller, M., Sztalryd, C., Southall, N., Bell, M., Jackle, H., Auld, D.S. et Oliver, B. (2008). COPI complex is a regulator of lipid homeostasis. *PLoS Biol*, 6(11), e292.
- Benhamed, F., Denechaud, P.D., Lemoine, M., Robichon, C., Moldes, M., Bertrand-Michel, J., Ratzu, V., Serfaty, L., Housset, C., Capeau, J., Girard, J., Guillou, H. et Postic, C. (2012). The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates



- hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest*, 122(6), 2176-2194.
- Berardinelli, S.D., Fischer, R.M. et Katz, I. (1956). Congenital absence of the pectoral muscle. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, 76(3), 599-604.
- Berardinelli, W. (1954). An undiagnosed endocrinometabolic syndrome: report of 2 cases. *J Clin Endocrinol Metab*, 14(2), 193-204.
- Berlenga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J.A. et Auguet, T. (2014). Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*, 7, 221-239.
- Bernsmeier, C., Calabrese, D., Heim, M.H. et Duong, H.T. (2014). Hepatitis C virus dysregulates glucose homeostasis by a dual mechanism involving induction of PGC1 $\alpha$  and dephosphorylation of FoxO1. *J Viral Hepat*, 21(1), 9-18.
- Bertola, A., Mathews, S., Ki, S.H., Wang, H. et Gao, B. (2013). Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc*, 8(3), 627-637.
- Bertola, A., Park, O. et Gao, B. (2013). Chronic plus binge ethanol feeding synergistically induces neutrophil infiltration and liver injury in mice: a critical role for E-selectin. *Hepatology*, 58(5), 1814-1823.
- Berzigotti, A., Saran, U. et Dufour, J.F. (2016). Physical activity and liver diseases. *Hepatology*, 63(3), 1026-1040.
- Bi, J., Wang, W., Liu, Z., Huang, X., Jiang, Q., Liu, G., Wang, Y. et Huang, X. (2014). Seipin promotes adipose tissue fat storage through the ER Ca(2)(+)-ATPase SERCA. *Cell Metab*, 19(5), 861-871.
- Bickel, P.E., Tansey, J.T. et Welte, M.A. (2009). PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta*, 1791(6), 419-440.
- Bitter, A., Nussler, A.K., Thasler, W.E., Klein, K., Zanger, U.M., Schwab, M. et Burk, O. (2015). Human sterol regulatory element-binding protein 1 $\alpha$  contributes significantly to hepatic lipogenic gene expression. *Cell Physiol Biochem*, 35(2), 803-815.
- Bjermo, H. et Riserus, U. (2010). Role of hepatic desaturases in obesity-related metabolic disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13(6), 703-708.
- Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Barber, T., Coxey, R.A., Takeda, T., Rondinone, C.M., Theodorakis, J.L., Greenberg, A.S. et Londos, C. (1995). Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res*, 36(6), 1211-1226.
- Bligh, E.G. et Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37(8), 911-917.

- Boden, G., Song, W., Duan, X., Cheung, P., Kresge, K., Barrero, C. et Merali, S. (2011). Infusion of glucose and lipids at physiological rates causes acute endoplasmic reticulum stress in rat liver. *Obesity (Silver Spring)*, 19(7), 1366-1373.
- Bolker, H.I., Fishman, S., Heard, R.D., O'Donnell, V.J., Webb, J.L. et Willis, G.C. (1956). The incorporation of acetate-1-C14 into cholesterol and fatty acids by surviving tissues of normal and scorbutic guinea pigs. *J Exp Med*, 103(2), 199-205.
- Borowsky, S.A., Strome, S. et Lott, E. (1981). Continued heavy drinking and survival in alcoholic cirrhotics. *Gastroenterology*, 80(6), 1405-1409.
- Bose, S.K., Kim, H., Meyer, K., Wolins, N., Davidson, N.O. et Ray, R. (2014). Forkhead box transcription factor regulation and lipid accumulation by hepatitis C virus. *J Virol*, 88(8), 4195-4203.
- Boutet, E., El Mourabit, H., Prot, M., Nemani, M., Khallouf, E., Colard, O., Maurice, M., Durand-Schneider, A.M., Chretien, Y., Gres, S., Wolf, C., Saulnier-Blache, J.S., Capeau, J. et Magre, J. (2009). Seipin deficiency alters fatty acid Delta9 desaturation and lipid droplet formation in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *Biochimie*, 91(6), 796-803.
- Brasaemle, D.L. et Wolins, N.E. (2012). Packaging of fat: an evolving model of lipid droplet assembly and expansion. *J Biol Chem*, 287(4), 2273-2279.
- Brown, J.M., Chung, S., Sawyer, J.K., Degirolamo, C., Alger, H.M., Nguyen, T., Zhu, X., Duong, M.N., Wibley, A.L., Shah, R., Davis, M.A., Kelley, K., Wilson, M.D., Kent, C., Parks, J.S. et Rudel, L.L. (2008). Inhibition of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 dissociates insulin resistance and obesity from atherosclerosis. *Circulation*, 118(14), 1467-1475.
- Browning, J.D. et Horton, J.D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*, 114(2), 147-152.
- Buhman, K.K., Chen, H.C. et Farese, R.V., Jr. (2001). The enzymes of neutral lipid synthesis. *J Biol Chem*, 276(44), 40369-40372.
- Burhans, M.S., Flowers, M.T., Harrington, K.R., Bond, L.M., Guo, C.A., Anderson, R.M. et Ntambi, J.M. (2015). Hepatic oleate regulates adipose tissue lipogenesis and fatty acid oxidation. *J Lipid Res*, 56(2), 304-318.
- Cabre, E., Rodriguez-Iglesias, P., Caballeria, J., Quer, J.C., Sanchez-Lombrana, J.L., Pares, A., Papo, M., Planas, R. et Gassull, M.A. (2000). Short- and long-term outcome of severe alcohol-induced hepatitis treated with steroids or enteral nutrition: a multicenter randomized trial. *Hepatology*, 32(1), 36-42.

- Caldwell, S.H., Swerdlow, R.H., Khan, E.M., Iezzoni, J.C., Hespenheide, E.E., Parks, J.K. et Parker, W.D., Jr. (1999). Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, 31(3), 430-434.
- Cao, J., Dai, D.L., Yao, L., Yu, H.H., Ning, B., Zhang, Q., Chen, J., Cheng, W.H., Shen, W. et Yang, Z.X. (2012). Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. *Mol Cell Biochem*, 364(1-2), 115-129.
- Capanni, M., Calella, F., Biagini, M.R., Genise, S., Raimondi, L., Bedogni, G., Svegliati-Baroni, G., Sofi, F., Milani, S., Abbate, R., Surrenti, C. et Casini, A. (2006). Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther*, 23(8), 1143-1151.
- Carr, R.M. et Ahima, R.S. (2016). Pathophysiology of lipid droplet proteins in liver diseases. *Exp Cell Res*, 340(2), 187-192.
- Cartwright, B.R., Binns, D.D., Hilton, C.L., Han, S., Gao, Q. et Goodman, J.M. (2014). Seipin performs dissectible functions in promoting lipid droplet biogenesis and regulating droplet morphology. *Mol Biol Cell*
- Cartwright, B.R. et Goodman, J.M. (2012). Seipin: from human disease to molecular mechanism. *J Lipid Res*, 53(6), 1042-1055.
- Caviglia, J.M., Gayet, C., Ota, T., Hernandez-Ono, A., Conlon, D.M., Jiang, H., Fisher, E.A. et Ginsberg, H.N. (2011). Different fatty acids inhibit apoB100 secretion by different pathways: unique roles for ER stress, ceramide, and autophagy. *J Lipid Res*, 52(9), 1636-1651.
- Cha, J.Y. et Repa, J.J. (2007). The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem*, 282(1), 743-751.
- Chakravarthy, M.V., Lodhi, I.J., Yin, L., Malapaka, R.R., Xu, H.E., Turk, J. et Semenkovich, C.F. (2009). Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell*, 138(3), 476-488.
- Chakravarthy, M.V., Pan, Z., Zhu, Y., Tordjman, K., Schneider, J.G., Coleman, T., Turk, J. et Semenkovich, C.F. (2005). "New" hepatic fat activates PPARalpha to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab*, 1(5), 309-322.
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J.E., Diehl, A.M., Brunt, E.M., Cusi, K., Charlton, M. et Sanyal, A.J. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association

- for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*, 55(6), 2005-2023.
- Chang, T.Y., Li, B.L., Chang, C.C. et Urano, Y. (2009). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(1), E1-9.
- Charron, G., Zhang, M.M., Yount, J.S., Wilson, J., Raghavan, A.S., Shamir, E. et Hang, H.C. (2009). Robust fluorescent detection of protein fatty-acylation with chemical reporters. *J Am Chem Soc*, 131(13), 4967-4975.
- Chavez, J.A. et Summers, S.A. (2012). A ceramide-centric view of insulin resistance. *Cell Metab*, 15(5), 585-594.
- Chen, C., Shah, Y.M., Morimura, K., Krausz, K.W., Miyazaki, M., Richardson, T.A., Morgan, E.T., Ntambi, J.M., Idle, J.R. et Gonzalez, F.J. (2008). Metabolomics reveals that hepatic stearyl-CoA desaturase 1 downregulation exacerbates inflammation and acute colitis. *Cell Metab*, 7(2), 135-147.
- Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J.L. et Brown, M.S. (2004). Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(31), 11245-11250.
- Chen, P., Torralba, M., Tan, J., Embree, M., Zengler, K., Starkel, P., van Pijkeren, J.P., DePew, J., Loomba, R., Ho, S.B., Bajaj, J.S., Mutlu, E.A., Keshavarzian, A., Tsukamoto, H., Nelson, K.E., Fouts, D.E. et Schnabl, B. (2015). Supplementation of saturated long-chain fatty acids maintains intestinal eubiosis and reduces ethanol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology*, 148(1), 203-214 e216.
- Chen, W., Chang, B., Saha, P., Hartig, S.M., Li, L., Reddy, V.T., Yang, Y., Yechoor, V., Mancini, M.A. et Chan, L. (2012). Berardinelli-seip congenital lipodystrophy 2/seipin is a cell-autonomous regulator of lipolysis essential for adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*, 32(6), 1099-1111.
- Chen, W., Yechoor, V.K., Chang, B.H., Li, M.V., March, K.L. et Chan, L. (2009). The human lipodystrophy gene product Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2/seipin plays a key role in adipocyte differentiation. *Endocrinology*, 150(10), 4552-4561.
- Chen, W., Zhou, H., Saha, P., Li, L. et Chan, L. (2014). Molecular mechanisms underlying fasting modulated liver insulin sensitivity and metabolism in male lipodystrophic Bsl2/Seipin-deficient mice. *Endocrinology*, 155(11), 4215-4225.
- Cheon, Y., Nara, T.Y., Band, M.R., Beever, J.E., Wallig, M.A. et Nakamura, M.T. (2005). Induction of overlapping genes by fasting and a peroxisome



- proliferator in pigs: evidence of functional PPARalpha in nonproliferating species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288(6), R1525-1535.
- Cho, J., Koh, Y., Han, J., Kim, D., Kim, T. et Kang, H. (2016). Adiponectin mediates the additive effects of combining daily exercise with caloric restriction for treatment of non-alcoholic fatty liver. *Int J Obes (Lond)*
- Choi, C.S., Savage, D.B., Kulkarni, A., Yu, X.X., Liu, Z.X., Morino, K., Kim, S., Distefano, A., Samuel, V.T., Neschen, S., Zhang, D., Wang, A., Zhang, X.M., Kahn, M., Cline, G.W., Pandey, S.K., Geisler, J.G., Bhanot, S., Monia, B.P. et Shulman, G.I. (2007). Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *J Biol Chem*, 282(31), 22678-22688.
- Christianson, J.L., Nicoloso, S., Straubhaar, J. et Czech, M.P. (2008). Stearoyl-CoA desaturase 2 is required for peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and adipogenesis in cultured 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*, 283(5), 2906-2916.
- Chu, K., Miyazaki, M., Man, W.C. et Ntambi, J.M. (2006). Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol Cell Biol*, 26(18), 6786-6798.
- Clarys, P. et Barel, A. (1995). Quantitative evaluation of skin surface lipids. *Clin Dermatol*, 13(4), 307-321.
- Cnop, M., Landchild, M.J., Vidal, J., Havel, P.J., Knowles, N.G., Carr, D.R., Wang, F., Hull, R.L., Boyko, E.J., Retzlaff, B.M., Walden, C.E., Knopp, R.H. et Kahn, S.E. (2002). The concurrent accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance and plasma leptin concentrations : distinct metabolic effects of two fat compartments. *Diabetes*, 51(4), 1005-1015.
- Cohen, J.C., Horton, J.D. et Hobbs, H.H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*, 332(6037), 1519-1523.
- Cohen, P., Miyazaki, M., Soccia, N.D., Hagge-Greenberg, A., Liedtke, W., Soukas, A.A., Sharma, R., Hudgins, L.C., Ntambi, J.M. et Friedman, J.M. (2002). Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science*, 297(5579), 240-243.
- Coleman, R.A. et Mashek, D.G. (2011). Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. *Chem Rev*, 111(10), 6359-6386.
- Coll, T., Eyre, E., Rodriguez-Calvo, R., Palomer, X., Sanchez, R.M., Merlos, M., Laguna, J.C. et Vazquez-Carrera, M. (2008). Oleate reverses palmitate-



- induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, 283(17), 11107-11116.
- Collins, J.M., Neville, M.J., Hoppa, M.B. et Frayn, K.N. (2010). De novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase are coordinately regulated in the human adipocyte and protect against palmitate-induced cell injury. *J Biol Chem*, 285(9), 6044-6052.
- Corton, J.M., Gillespie, J.G. et Hardie, D.G. (1994). Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol*, 4(4), 315-324.
- Crespo, J., Cayon, A., Fernandez-Gil, P., Hernandez-Guerra, M., Mayorga, M., Dominguez-Diez, A., Fernandez-Escalante, J.C. et Pons-Romero, F. (2001). Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*, 34(6), 1158-1163.
- Cui, X., Wang, Y., Tang, Y., Liu, Y., Zhao, L., Deng, J., Xu, G., Peng, X., Ju, S., Liu, G. et Yang, H. (2011). Seipin ablation in mice results in severe generalized lipodystrophy. *Hum Mol Genet*, 20(15), 3022-3030.
- Dasarathy, S., Dasarathy, J., Khiyami, A., Yerian, L., Hawkins, C., Sargent, R. et McCullough, A.J. (2015). Double-blind randomized placebo-controlled clinical trial of omega 3 fatty acids for the treatment of diabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*, 49(2), 137-144.
- Day, C.P. et James, O.F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*, 114(4), 842-845.
- de Keyser, C.E., Koehler, E.M., Schouten, J.N., Visser, L.E., Hofman, A., Janssen, H.L. et Stricker, B.H. (2014). Statin therapy is associated with a reduced risk of non-alcoholic fatty liver in overweight individuals. *Dig Liver Dis*, 46(8), 720-725.
- Decaux, J.F., Antoine, B. et Kahn, A. (1989). Regulation of the expression of the L-type pyruvate kinase gene in adult rat hepatocytes in primary culture. *J Biol Chem*, 264(20), 11584-11590.
- Denechaud, P.D., Dentin, R., Girard, J. et Postic, C. (2008). Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett*, 582(1), 68-73.
- Dentin, R., Benhamed, F., Hainault, I., Fauveau, V., Foufelle, F., Dyck, J.R., Girard, J. et Postic, C. (2006). Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes*, 55(8), 2159-2170.
- Dentin, R., Benhamed, F., Pegorier, J.P., Foufelle, F., Viollet, B., Vaulont, S., Girard, J. et Postic, C. (2005). Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest*, 115(10), 2843-2854.

- Dentin, R., Girard, J. et Postic, C. (2005). Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie*, 87(1), 81-86.
- Dentin, R., Pegorier, J.P., Benhamed, F., Foufelle, F., Ferre, P., Fauveau, V., Magnuson, M.A., Girard, J. et Postic, C. (2004). Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem*, 279(19), 20314-20326.
- Desvergne, B. et Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, 20(5), 649-688.
- Diraison, F., Moulin, P. et Beylot, M. (2003). Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab*, 29(5), 478-485.
- Dobrzyn, A., Dobrzyn, P., Miyazaki, M., Sampath, H., Chu, K. et Ntambi, J.M. (2005). Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases CTP:choline cytidyltransferase translocation into the membrane and enhances phosphatidylcholine synthesis in liver. *J Biol Chem*, 280(24), 23356-23362.
- Dobrzyn, P., Dobrzyn, A., Miyazaki, M., Cohen, P., Asilmaz, E., Hardie, D.G., Friedman, J.M. et Ntambi, J.M. (2004). Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(17), 6409-6414.
- Doherty, G.M., Jensen, J.C., Alexander, H.R., Buresh, C.M. et Norton, J.A. (1991). Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery*, 110(2), 192-198.
- Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D. et Parks, E.J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 115(5), 1343-1351.
- Dorn, C., Riener, M.O., Kirovski, G., Saugspier, M., Steib, K., Weiss, T.S., Gabele, E., Kristiansen, G., Hartmann, A. et Hellerbrand, C. (2010). Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Exp Pathol*, 3(5), 505-514.
- Dossi, C.G., Tapia, G.S., Espinosa, A., Videla, L.A. et D'Espessailles, A. (2014). Reversal of high-fat diet-induced hepatic steatosis by n-3 LCPUFA: role of PPAR-alpha and SREBP-1c. *J Nutr Biochem*, 25(9), 977-984.

- Ducheix, S., Montagner, A., Theodorou, V., Ferrier, L. et Guillou, H. (2013). The liver X receptor: a master regulator of the gut-liver axis and a target for non alcoholic fatty liver disease. *Biochem Pharmacol*, 86(1), 96-105.
- Eagon, P.K. (2010). Alcoholic liver injury: influence of gender and hormones. *World J Gastroenterol*, 16(11), 1377-1384.
- Eguchi, Y., Eguchi, T., Mizuta, T., Ide, Y., Yasutake, T., Iwakiri, R., Hisatomi, A., Ozaki, I., Yamamoto, K., Kitajima, Y., Kawaguchi, Y., Kuroki, S. et Ono, N. (2006). Visceral fat accumulation and insulin resistance are important factors in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*, 41(5), 462-469.
- Endo, M., Masaki, T., Seike, M. et Yoshimatsu, H. (2007). TNF-alpha induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). *Exp Biol Med (Maywood)*, 232(5), 614-621.
- Evans, R.M., Barish, G.D. et Wang, Y.X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*, 10(4), 355-361.
- Fabbrini, E., Sullivan, S. et Klein, S. (2010). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*, 51(2), 679-689.
- Fan, C.Y., Pan, J., Chu, R., Lee, D., Kluckman, K.D., Usuda, N., Singh, I., Yeldandi, A.V., Rao, M.S., Maeda, N. et Reddy, J.K. (1996). Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem*, 271(40), 24698-24710.
- Fang, D L., Wan, Y., Shen, W., Cao, J., Sun, Z.X., Yu, H.H., Zhang, Q., Cheng, W.H., Chen, J. et Ning, B. (2013). Endoplasmic reticulum stress leads to lipid accumulation through upregulation of SREBP-1c in normal hepatic and hepatoma cells. *Mol Cell Biochem*, 381(1-2), 127-137.
- Farese, R.V., Jr. et Walther, T.C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*, 139(5), 855-860.
- Fatima, A., Waters, S., O'Boyle, P., Seoighe, C. et Morris, D.G. (2014). Alterations in hepatic miRNA expression during negative energy balance in postpartum dairy cattle. *BMC Genomics*, 15, 28.
- Fearns, C. et Loskutoff, D.J. (1997). Induction of plasminogen activator inhibitor 1 gene expression in murine liver by lipopolysaccharide. Cellular localization and role of endogenous tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol*, 150(2), 579-590.
- Febbraio, M., Abumrad, N.A., Hajjar, D.P., Sharma, K., Cheng, W., Pearce, S.F. et Silverstein, R.L. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an

- important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*, 274(27), 19055-19062.
- Fei, W., Du, X. et Yang, H. (2011). Seipin, adipogenesis and lipid droplets. *Trends Endocrinol Metab*, 22(6), 204-210.
- Fei, W., Li, H., Shui, G., Kapterian, T.S., Bielby, C., Du, X., Brown, A.J., Li, P., Wenk, M.R., Liu, P. et Yang, H. (2011). Molecular characterization of seipin and its mutants: implications for seipin in triacylglycerol synthesis. *J Lipid Res*, 52(12), 2136-2147.
- Fei, W., Shui, G., Gaeta, B., Du, X., Kuerschner, L., Li, P., Brown, A.J., Wenk, M.R., Parton, R.G. et Yang, H. (2008). Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *J Cell Biol*, 180(3), 473-482.
- Fei, W., Shui, G., Zhang, Y., Krahmer, N., Ferguson, C., Kapterian, T.S., Lin, R.C., Dawes, I.W., Brown, A.J., Li, P., Huang, X., Parton, R.G., Wenk, M.R., Walther, T.C. et Yang, H. (2011). A role for phosphatidic acid in the formation of "supersized" lipid droplets. *PLoS Genet*, 7(7), e1002201.
- Feingold, K.R., Hardardottir, I. et Grunfeld, C. (1998). Beneficial effects of cytokine induced hyperlipidemia. *Z Ernahrungswiss*, 37 Suppl 1, 66-74.
- Feng, B., Yao, P.M., Li, Y., Devlin, C.M., Zhang, D., Harding, H.P., Sweeney, M., Rong, J.X., Kuriakose, G., Fisher, E.A., Marks, A.R., Ron, D. et Tabas, I. (2003). The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol*, 5(9), 781-792.
- Fernandez, C., Schuhmann, K., Herzog, R., Fielding, B., Frayn, K., Shevchenko, A., James, P., Holm, C. et Strom, K. (2011). Altered desaturation and elongation of fatty acids in hormone-sensitive lipase null mice. *PLoS One*, 6(6), e21603.
- Finck, B.N., Gropler, M.C., Chen, Z., Leone, T.C., Croce, M.A., Harris, T.E., Lawrence, J.C., Jr. et Kelly, D.P. (2006). Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metab*, 4(3), 199-210.
- Flachs, P., Horakova, O., Brauner, P., Rossmeisl, M., Pecina, P., Franssen-van Hal, N., Ruzickova, J., Sponarova, J., Drahota, Z., Vlcek, C., Keijer, J., Houstek, J. et Kopecky, J. (2005). Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia*, 48(11), 2365-2375.
- Flowers, M.T. et Ntambi, J.M. (2008). Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 19(3), 248-256.
- Flowers, M.T., Paton, C.M., O'Byrne, S.M., Schiesser, K., Dawson, J.A., Blaner, W.S., Kendzierski, C. et Ntambi, J.M. (2011). Metabolic changes in skin



- caused by *Scd1* deficiency: a focus on retinol metabolism. *PLoS One*, 6(5), e19734.
- Foretz, M., Carling, D., Guichard, C., Ferre, P. et Foufelle, F. (1998). AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 273(24), 14767-14771.
- Foufelle, F. et Ferre, P. (2002). New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J*, 366(Pt 2), 377-391.
- Foufelle, F., Gouhot, B., Pegorier, J.P., Perdureau, D., Girard, J. et Ferre, P. (1992). Glucose stimulation of lipogenic enzyme gene expression in cultured white adipose tissue. A role for glucose 6-phosphate. *J Biol Chem*, 267(29), 20543-20546.
- Frangioudakis, G., Burchfield, J.G., Narasimhan, S., Cooney, G.J., Leitges, M., Biden, T.J. et Schmitz-Peiffer, C. (2009). Diverse roles for protein kinase C delta and protein kinase C epsilon in the generation of high-fat-diet-induced glucose intolerance in mice: regulation of lipogenesis by protein kinase C delta. *Diabetologia*, 52(12), 2616-2620.
- Fromenty, B., Robin, M.A., Igoudjil, A., Mansouri, A. et Pessayre, D. (2004). The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab*, 30(2), 121-138.
- Fu, S., Watkins, S.M. et Hotamisligil, G.S. (2012). The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metab*, 15(5), 623-634.
- Fujii, H., Ikura, Y., Arimoto, J., Sugioka, K., Iezzoni, J.C., Park, S.H., Naruko, T., Itabe, H., Kawada, N., Caldwell, S.H. et Ueda, M. (2009). Expression of perilipin and adipophilin in nonalcoholic fatty liver disease; relevance to oxidative injury and hepatocyte ballooning. *J Atheroscler Thromb*, 16(6), 893-901.
- Gaggini, M., Morelli, M., Buzzigoli, E., DeFronzo, R.A., Bugianesi, E. et Gastaldelli, A. (2013). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*, 5(5), 1544-1560.
- Galbo, T., Perry, R.J., Jurczak, M.J., Camporez, J.P., Alves, T.C., Kahn, M., Guigni, B.A., Serr, J., Zhang, D., Bhanot, S., Samuel, V.T. et Shulman, G.I. (2013). Saturated and unsaturated fat induce hepatic insulin resistance independently of TLR-4 signaling and ceramide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(31), 12780-12785.



- Galli, A., Pinaire, J., Fischer, M., Dorris, R. et Crabb, D.W. (2001). The transcriptional and DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is inhibited by ethanol metabolism. A novel mechanism for the development of ethanol-induced fatty liver. *J Biol Chem*, 276(1), 68-75.
- Gao, M., Wang, M., Guo, X., Qiu, X., Liu, L., Liao, J., Liu, J., Lu, G., Wang, Y. et Liu, G. (2015). Expression of seipin in adipose tissue rescues lipodystrophy, hepatic steatosis and insulin resistance in seipin null mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 460(2), 143-150.
- Garcia Caraballo, S.C., Comhair, T.M., Dejong, C.H., Lamers, W.H. et Kohler, S.E. (2014). A high-protein diet is anti-steatotic and has no pro-inflammatory side effects in dyslipidaemic APOE2 knock-in mice. *Br J Nutr*, 112(8), 1251-1265.
- Garg, A. (2011). Clinical review#: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(11), 3313-3325.
- Gary-Bobo, M., Elachouri, G., Gallas, J.F., Janiak, P., Marini, P., Ravinet-Trillou, C., Chabbert, M., Cruccioli, N., Pfersdorff, C., Roque, C., Arnone, M., Croci, T., Soubrie, P., Oury-Donat, F., Maffrand, J.P., Scatton, B., Lacheretz, F., Le Fur, G., Herbert, J.M. et Bensaid, M. (2007). Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology*, 46(1), 122-129.
- Gentile, C.L., Frye, M. et Pagliassotti, M.J. (2011). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Antioxid Redox Signal*, 15(2), 505-521.
- Gibbons, G.F. (1990). Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem J*, 268(1), 1-13.
- Glatz, J.F. (2014). Lipids and lipid binding proteins: A perfect match. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*
- Goceri, E., Shah, Z.K., Layman, R., Jiang, X. et Gurcan, M.N. (2016). Quantification of liver fat: A comprehensive review. *Comput Biol Med*, 71, 174-189.
- Goel, R., Boylan, B., Gruman, L., Newman, P.J., North, P.E. et Newman, D.K. (2007). The proinflammatory phenotype of PECAM-1-deficient mice results in atherogenic diet-induced steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293(6), G1205-1214.
- Gormaz, J.G., Rodrigo, R., Videla, L.A. et Beems, M. (2010). Biosynthesis and bioavailability of long-chain polyunsaturated fatty acids in non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res*, 49(4), 407-419.
- Griffett, K., Solt, L.A., El-Gendy Bel, D., Kamenecka, T.M. et Burris, T.P. (2013). A liver-selective LXR inverse agonist that suppresses hepatic steatosis. *ACS Chem Biol*, 8(3), 559-567.

- Grippa, A., Buxo, L., Mora, G., Funaya, C., Idrissi, F.Z., Mancuso, F., Gomez, R., Muntanya, J., Sabido, E. et Carvalho, P. (2015). The seipin complex Fld1/Ldb16 stabilizes ER-lipid droplet contact sites. *J Cell Biol*, 211(4), 829-844.
- Guo, Y., Cordes, K.R., Farese, R.V., Jr. et Walther, T.C. (2009). Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 6), 749-752.
- Guo, Y., Walther, T.C., Rao, M., Stuurman, N., Goshima, G., Terayama, K., Wong, J.S., Vale, R.D., Walter, P. et Farese, R.V. (2008). Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature*, 453(7195), 657-661.
- Hampton, R.Y. (2002). ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 14(4), 476-482.
- Han, H., Hu, J., Lau, M.Y., Feng, M., Petrovic, L.M. et Ji, C. (2013). Altered methylation and expression of ER-associated degradation factors in long-term alcohol and constitutive ER stress-induced murine hepatic tumors. *Front Genet*, 4, 224.
- Hannah, V.C., Ou, J., Luong, A., Goldstein, J.L. et Brown, M.S. (2001). Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem*, 276(6), 4365-4372.
- Hannoush, R.N. et Arenas-Ramirez, N. (2009). Imaging the lipidome: omega-alkynyl fatty acids for detection and cellular visualization of lipid-modified proteins. *ACS Chem Biol*, 4(7), 581-587.
- Hannoush, R.N. et Sun, J. (2010). The chemical toolbox for monitoring protein fatty acylation and prenylation. *Nat Chem Biol*, 6(7), 498-506.
- Harbrecht, B.G., Taylor, B.S., Xu, Z., Ramalakshmi, S., Ganster, R.W. et Geller, D.A. (2001). cAMP inhibits inducible nitric oxide synthase expression and NF-kappaB-binding activity in cultured rat hepatocytes. *J Surg Res*, 99(2), 258-264.
- Harbrecht, B.G., Wirant, E.M., Kim, Y.M. et Billiar, T.R. (1996). Glucagon inhibits hepatocyte nitric oxide synthesis. *Arch Surg*, 131(12), 1266-1272.
- Harris, C.A., Haas, J.T., Streeper, R.S., Stone, S.J., Kumari, M., Yang, K., Han, X., Brownell, N., Gross, R.W., Zechner, R. et Farese, R.V., Jr. (2011). DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res*, 52(4), 657-667.
- Harrison, S.A., Torgerson, S., Hayashi, P., Ward, J. et Schenker, S. (2003). Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*, 98(11), 2485-2490.

- He, J., Lee, J.H., Febbraio, M. et Xie, W. (2011). The emerging roles of fatty acid translocase/CD36 and the aryl hydrocarbon receptor in fatty liver disease. *Exp Biol Med* (Maywood), 236(10), 1116-1121.
- Henin, N., Vincent, M.F., Gruber, H.E. et Van den Berghe, G. (1995). Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *FASEB J*, 9(7), 541-546.
- Her, G.M., Pai, W.Y., Lai, C.Y., Hsieh, Y.W. et Pang, H.W. (2013). Ubiquitous transcription factor YY1 promotes zebrafish liver steatosis and lipotoxicity by inhibiting CHOP-10 expression. *Biochim Biophys Acta*, 1831(6), 1037-1051.
- Higashida, R.T., Halbach, V.V., Dowd, C.F., Barnwell, S.L. et Hieshima, G.B. (1991). Intracranial aneurysms: interventional neurovascular treatment with detachable balloons--results in 215 cases. *Radiology*, 178(3), 663-670.
- Higuchi, N., Kato, M., Shundo, Y., Tajiri, H., Tanaka, M., Yamashita, N., Kohjima, M., Kotoh, K., Nakamuta, M., Takayanagi, R. et Enjoji, M. (2008). Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*, 38(11), 1122-1129.
- Hoeben, R.C. et Uil, T.G. (2013). Adenovirus DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(3), a013003.
- Hofmann, K. (2000). A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem Sci*, 25(3), 111-112.
- Holtta-Vuori, M., Salo, V.T., Ohsaki, Y., Suster, M.L. et Ikonen, E. (2013). Alleviation of seipinopathy-related ER stress by triglyceride storage. *Hum Mol Genet*, 22(6), 1157-1166.
- Hooper, A.J., Adams, L.A. et Burnett, J.R. (2011). Genetic determinants of hepatic steatosis in man. *J Lipid Res*, 52(4), 593-617.
- Horie, Y., Suzuki, A., Kataoka, E., Sasaki, T., Hamada, K., Sasaki, J., Mizuno, K., Hasegawa, G., Kishimoto, H., Iizuka, M., Naito, M., Enomoto, K., Watanabe, S., Mak, T.W. et Nakano, T. (2004). Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest*, 113(12), 1774-1783.
- Hu, C.D., Chinenov, Y. et Kerppola, T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*, 9(4), 789-798.
- Hu, M., Yin, H., Mitra, M.S., Liang, X., Ajmo, J.M., Nadra, K., Chrast, R., Finck, B.N. et You, M. (2013). Hepatic-specific lipin-1 deficiency exacerbates experimental alcohol-induced steatohepatitis in mice. *Hepatology*, 58(6), 1953-1963.

- Hyun, C.K., Kim, E.D., Flowers, M.T., Liu, X., Kim, E., Strable, M. et Ntambi, J.M. (2010). Adipose-specific deletion of stearoyl-CoA desaturase 1 up-regulates the glucose transporter GLUT1 in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 399(4), 480-486.
- Ibdah, J.A., Paul, H., Zhao, Y., Binford, S., Salleng, K., Cline, M., Matern, D., Bennett, M.J., Rinaldo, P. et Strauss, A.W. (2001). Lack of mitochondrial trifunctional protein in mice causes neonatal hypoglycemia and sudden death. *J Clin Invest*, 107(11), 1403-1409.
- Ibdah, J.A., Perlegas, P., Zhao, Y., Angdisen, J., Borgerink, H., Shadoan, M.K., Wagner, J.D., Matern, D., Rinaldo, P. et Cline, J.M. (2005). Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. *Gastroenterology*, 128(5), 1381-1390.
- Igal, R.A. (2011). Roles of StearoylCoA Desaturase-1 in the Regulation of Cancer Cell Growth, Survival and Tumorigenesis. *Cancers (Basel)*, 3(2), 2462-2477.
- Inoue, M., Ohtake, T., Motomura, W., Takahashi, N., Hosoki, Y., Miyoshi, S., Suzuki, Y., Saito, H., Kohgo, Y. et Okumura, T. (2005). Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 336(1), 215-222.
- Ishii, S., Iizuka, K., Miller, B.C. et Uyeda, K. (2004). Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(44), 15597-15602.
- Israel, Y., Kalant, H., Khanna, J.M., Orrego, H., Phillips, M.J. et Stewart, D.J. (1977). Ethanol metabolism, oxygen availability and alcohol induced liver damage. *Adv Exp Med Biol*, 85A, 343-358.
- Ito, D. et Suzuki, N. (2009). Seipinopathy: a novel endoplasmic reticulum stress-associated disease. *Brain*, 132(Pt 1), 8-15.
- Ito, M., Suzuki, J., Tsujioka, S., Sasaki, M., Gomori, A., Shirakura, T., Hirose, H., Ito, M., Ishihara, A., Iwaasa, H. et Kanatani, A. (2007). Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatol Res*, 37(1), 50-57.
- Itoh, M., Suganami, T., Nakagawa, N., Tanaka, M., Yamamoto, Y., Kamei, Y., Terai, S., Sakaida, I. et Ogawa, Y. (2011). Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol*, 179(5), 2454-2463.
- Jacome-Sosa, M.M. et Parks, E.J. (2014). Fatty acid sources and their fluxes as they contribute to plasma triglyceride concentrations and fatty liver in humans. *Curr Opin Lipidol*, 25(3), 213-220.



- Jacquier, N., Choudhary, V., Mari, M., Toulmay, A., Reggiori, F. et Schneider, R. (2011). Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 124(Pt 14), 2424-2437.
- Jacquier, N., Mishra, S., Choudhary, V. et Schneider, R. (2013). Expression of oleosin and perilipins in yeast promotes formation of lipid droplets from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, 126(Pt 22), 5198-5209.
- Javor, E.D., Ghany, M.G., Cochran, E.K., Oral, E.A., DePaoli, A.M., Premkumar, A., Kleiner, D.E. et Gorden, P. (2005). Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy. *Hepatology*, 41(4), 753-760.
- Ji, C., Chan, C. et Kaplowitz, N. (2006). Predominant role of sterol response element binding proteins (SREBP) lipogenic pathways in hepatic steatosis in the murine intragastric ethanol feeding model. *J Hepatol*, 45(5), 717-724.
- Ji, C., Deng, Q. et Kaplowitz, N. (2004). Role of TNF-alpha in ethanol-induced hyperhomocysteinemia and murine alcoholic liver injury. *Hepatology*, 40(2), 442-451.
- Ji, C., Mehrian-Shai, R., Chan, C., Hsu, Y.H. et Kaplowitz, N. (2005). Role of CHOP in hepatic apoptosis in the murine model of intragastric ethanol feeding. *Alcohol Clin Exp Res*, 29(8), 1496-1503.
- Jiang, M., Gao, M., Wu, C., He, H., Guo, X., Zhou, Z., Yang, H., Xiao, X., Liu, G. et Sha, J. (2014). Lack of testicular seipin causes teratozoospermia syndrome in men. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(19), 7054-7059.
- Jin, F.Y., Kamanna, V.S. et Kashyap, M.L. (1999). Niacin accelerates intracellular ApoB degradation by inhibiting triacylglycerol synthesis in human hepatoblastoma (HepG2) cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(4), 1051-1059.
- Jones, B.H., Standridge, M.K., Claycombe, K.J., Smith, P.J. et Moustaid-Moussa, N. (1998). Glucose induces expression of stearoyl-CoA desaturase in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J*, 335 ( Pt 2), 405-408.
- Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Patel, P.H., Watson, M.A., Matsukuma, K.E., Walczak, R., Collins, J.L., Osborne, T.F. et Tontonoz, P. (2002). Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem*, 277(13), 11019-11025.
- Jump, D.B. (2011). Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 14(2), 115-120.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D. et Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*, 1(1), 15-25.



- Kantartzis, K., Machicao, F., Machann, J., Schick, F., Fritsche, A., Haring, H.U. et Stefan, N. (2009). The DGAT2 gene is a candidate for the dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans. *Clin Sci (Lond)*, 116(6), 531-537.
- Kanuri, G. et Bergheim, I. (2013). In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Int J Mol Sci*, 14(6), 11963-11980.
- Kaphalia, B.S., Bhopale, K.K., Kondraganti, S., Wu, H., Boor, P.J. et Ansari, G.A. (2010). Pancreatic injury in hepatic alcohol dehydrogenase-deficient deer mice after subchronic exposure to ethanol. *Toxicol Appl Pharmacol*, 246(3), 154-162.
- Kaplowitz, N. et Ji, C. (2006). Unfolding new mechanisms of alcoholic liver disease in the endoplasmic reticulum. *J Gastroenterol Hepatol*, 21 Suppl 3, S7-9.
- Kaufman, R.J. (2002). Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*, 110(10), 1389-1398.
- Kawasaki, T., Igarashi, K., Koeda, T., Sugimoto, K., Nakagawa, K., Hayashi, S., Yamaji, R., Inui, H., Fukusato, T. et Yamanouchi, T. (2009). Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J Nutr*, 139(11), 2067-2071.
- Kearns, P.J., Young, H., Garcia, G., Blaschke, T., O'Hanlon, G., Rinki, M., Sucher, K. et Gregory, P. (1992). Accelerated improvement of alcoholic liver disease with enteral nutrition. *Gastroenterology*, 102(1), 200-205.
- Kenny, P.R., Brady, D.E., Torres, D.M., Ragozzino, L., Chalasani, N. et Harrison, S.A. (2010). Exenatide in the treatment of diabetic patients with non-alcoholic steatohepatitis: a case series. *Am J Gastroenterol*, 105(12), 2707-2709.
- Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*, 2(4), 282-286.
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B. et Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*, 103(11), 1489-1498.
- Kessler, S.M., Simon, Y., Gemperlein, K., Gianmoena, K., Cadenas, C., Zimmer, V., Pokorny, J., Barghash, A., Helms, V., van Rooijen, N., Bohle, R.M., Lammert, F., Hengstler, J.G., Mueller, R., Haybaeck, J. et Kiemer, A.K. (2014). Fatty acid elongation in non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci*, 15(4), 5762-5773.
- Khovidhunkit, W., Kim, M.S., Memon, R.A., Shigenaga, J.K., Moser, A.H., Feingold, K.R. et Grunfeld, C. (2004). Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res*, 45(7), 1169-1196.

- Ki, S.H., Park, O., Zheng, M., Morales-Ibanez, O., Kolls, J.K., Bataller, R. et Gao, B. (2010). Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hepatology*, 52(4), 1291-1300.
- Kim, E., Lee, J.H., Ntambi, J.M. et Hyun, C.K. (2011). Inhibition of stearoyl-CoA desaturase1 activates AMPK and exhibits beneficial lipid metabolic effects in vitro. *Eur J Pharmacol*, 672(1-3), 38-44.
- Kim, M.S., Pinto, S.M., Getnet, D., Nirujogi, R.S., Manda, S.S., Chaerkady, R., Madugundu, A.K., Kelkar, D.S., Isserlin, R., Jain, S., Thomas, J.K., Muthusamy, B., Leal-Rojas, P., Kumar, P., Sahasrabudde, N.A., Balakrishnan, L., Advani, J., George, B., Renuse, S., Selvan, L.D., Patil, A.H., Nanjappa, V., Radhakrishnan, A., Prasad, S., Subbannayya, T., Raju, R., Kumar, M., Sreenivasamurthy, S.K., Marimuthu, A., Sathe, G.J., Chavan, S., Datta, K.K., Subbannayya, Y., Sahu, A., Yelamanchi, S.D., Jayaram, S., Rajagopalan, P., Sharma, J., Murthy, K.R., Syed, N., Goel, R., Khan, A.A., Ahmad, S., Dey, G., Mudgal, K., Chatterjee, A., Huang, T.C., Zhong, J., Wu, X., Shaw, P.G., Freed, D., Zahari, M.S., Mukherjee, K.K., Shankar, S., Mahadevan, A., Lam, H., Mitchell, C.J., Shankar, S.K., Satishchandra, P., Schroeder, J.T., Sirdeshmukh, R., Maitra, A., Leach, S.D., Drake, C.G., Halushka, M.K., Prasad, T.S., Hruban, R.H., Kerr, C.L., Bader, G.D., Iacobuzio-Donahue, C.A., Gowda, H. et Pandey, A. (2014). A draft map of the human proteome. *Nature*, 509(7502), 575-581.
- Kim, Y.C. et Ntambi, J.M. (1999). Regulation of stearoyl-CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 266(1), 1-4.
- Kim, Y.I., Hirai, S., Takahashi, H., Goto, T., Ohyane, C., Tsugane, T., Konishi, C., Fujii, T., Inai, S., Iijima, Y., Aoki, K., Shibata, D., Takahashi, N. et Kawada, T. (2011). 9-oxo-10(E),12(E)-Octadecadienoic acid derived from tomato is a potent PPAR alpha agonist to decrease triglyceride accumulation in mouse primary hepatocytes. *Mol Nutr Food Res*, 55(4), 585-593.
- Kirpich, I.A., Miller, M.E., Cave, M.C., Joshi-Barve, S. et McClain, C.J. (2016). Alcoholic Liver Disease: Update on the Role of Dietary Fat. *Biomolecules*, 6(1)
- Knight, M., Nelson-Piercy, C., Kurinczuk, J.J., Spark, P., Brocklehurst, P. et System, U.K.O.S. (2008). A prospective national study of acute fatty liver of pregnancy in the UK. *Gut*, 57(7), 951-956.
- Kodama, Y. et Hu, C.D. (2012). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. *Biotechniques*, 53(5), 285-298.

- Kohjima, M., Enjoji, M., Higuchi, N., Kato, M., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Fujino, T., Yada, M., Yada, R., Harada, N., Takayanagi, R. et Nakamuta, M. (2007). Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med*, 20(3), 351-358.
- Kohlwein, S.D., Veenhuis, M. et van der Klei, I.J. (2013). Lipid droplets and peroxisomes: key players in cellular lipid homeostasis or a matter of fat--store 'em up or burn 'em down. *Genetics*, 193(1), 1-50.
- Kong, B., Luyendyk, J.P., Tawfik, O. et Guo, G.L. (2009). Farnesoid X receptor deficiency induces nonalcoholic steatohepatitis in low-density lipoprotein receptor-knockout mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther*, 328(1), 116-122.
- Kono, H., Bradford, B.U., Yin, M., Sulik, K.K., Koop, D.R., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., McDonald, T., Dikalova, A., Kadiiska, M.B., Mason, R.P. et Thurman, R.G. (1999). CYP2E1 is not involved in early alcohol-induced liver injury. *Am J Physiol*, 277(6 Pt 1), G1259-1267.
- Koo, S.H., Dutcher, A.K. et Towle, H.C. (2001). Glucose and insulin function through two distinct transcription factors to stimulate expression of lipogenic enzyme genes in liver. *J Biol Chem*, 276(12), 9437-9445.
- Koszegi, T. (1991). Release kinetics of ATP in cells exposed to nonionic detergents. *J Biolumin Chemilumin*, 6(3), 153-157.
- Kotronen, A., Seppanen-Laakso, T., Westerbacka, J., Kiviluoto, T., Arola, J., Ruskeepaa, A.L., Oresic, M. et Yki-Jarvinen, H. (2009). Hepatic stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes*, 58(1), 203-208.
- Krawczyk, M., Bonfrate, L. et Portincasa, P. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 24(5), 695-708.
- Kucera, O. et Cervinkova, Z. (2014). Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol*, 20(26), 8364-8376.
- Labrie, M., Lalonde, S., Najyb, O., Thiery, M., Daneault, C., Des Rosiers, C., Rassart, E. et Mounier, C. (2015). Apolipoprotein D Transgenic Mice Develop Hepatic Steatosis through Activation of PPARgamma and Fatty Acid Uptake. *PLoS One*, 10(6), e0130230.
- Lambert, J.E., Ramos-Roman, M.A., Browning, J.D. et Parks, E.J. (2014). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 146(3), 726-735.
- Lamle, J., Marhenke, S., Borlak, J., von Wasielowski, R., Eriksson, C.J., Geffers, R., Manns, M.P., Yamamoto, M. et Vogel, A. (2008). Nuclear factor-eythroid 2-

- related factor 2 prevents alcohol-induced fulminant liver injury. *Gastroenterology*, 134(4), 1159-1168.
- Larter, C.Z., Yeh, M.M., Williams, J., Bell-Anderson, K.S. et Farrell, G.C. (2008). MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. *J Hepatol*, 49(3), 407-416.
- Lavoie, J.M. et Pighon, A. (2012). NAFLD, Estrogens, and Physical Exercise: The Animal Model. *J Nutr Metab*, 2012, 914938.
- Lawler, J.F., Jr., Yin, M., Diehl, A.M., Roberts, E. et Chatterjee, S. (1998). Tumor necrosis factor-alpha stimulates the maturation of sterol regulatory element binding protein-1 in human hepatocytes through the action of neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem*, 273(9), 5053-5059.
- Lawrence, R.D. (1946). Lipodystrophy and hepatomegaly, with diabetes, lipaemia, and other metabolic disturbances; a case throwing new light on the action of insulin. *Lancet*, 1(6403), 724 passim.
- Lee, J.J., Lambert, J.E., Hovhannisyan, Y., Ramos-Roman, M.A., Trombold, J.R., Wagner, D.A. et Parks, E.J. (2015). Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. *Am J Clin Nutr*, 101(1), 34-43.
- Lee, J.M., Lee, H., Kang, S. et Park, W.J. (2016). Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients*, 8(1)
- Lee, J.S., Zheng, Z., Mendez, R., Ha, S.W., Xie, Y. et Zhang, K. (2012). Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model. *Toxicol Lett*, 211(1), 29-38.
- Lefevre, P., Diot, C., Legrand, P. et Douaire, M. (1999). Hormonal regulation of stearoyl coenzyme-A desaturase 1 activity and gene expression in primary cultures of chicken hepatocytes. *Arch Biochem Biophys*, 368(2), 329-337.
- Lenihan-Geels, G., Bishop, K.S. et Ferguson, L.R. (2013). Alternative sources of omega-3 fats: can we find a sustainable substitute for fish? *Nutrients*, 5(4), 1301-1315.
- Levene, A.P. et Goldin, R.D. (2012). The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology*, 61(2), 141-152.
- Li, H.H., Tyburski, J.B., Wang, Y.W., Strawn, S., Moon, B.H., Kallakury, B.V., Gonzalez, F.J. et Fornace, A.J., Jr. (2014). Modulation of fatty acid and bile acid metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*, 38(6), 1520-1531.
- Li, X., Li, Y., Yang, W., Xiao, C., Fu, S., Deng, Q., Ding, H., Wang, Z., Liu, G. et Li, X. (2014). SREBP-1c overexpression induces triglycerides accumulation

- through increasing lipid synthesis and decreasing lipid oxidation and VLDL assembly in bovine hepatocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 143, 174-182.
- Li, X., Monks, B., Ge, Q. et Birnbaum, M.J. (2007). Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1 $\alpha$  transcription coactivator. *Nature*, 447(7147), 1012-1016.
- Li, Z. et Diehl, A.M. (2003). Innate immunity in the liver. *Curr Opin Gastroenterol*, 19(6), 565-571.
- Li, Z., Soloski, M.J. et Diehl, A.M. (2005). Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 42(4), 880-885.
- Li, Z.Z., Berk, M., McIntyre, T.M. et Feldstein, A.E. (2009). Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem*, 284(9), 5637-5644.
- Lieber, C.S., Leo, M.A., Mak, K.M., Xu, Y., Cao, Q., Ren, C., Ponomarenko, A. et DeCarli, L.M. (2004). Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr*, 79(3), 502-509.
- Lindstrom, P. (2007). The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *ScientificWorldJournal*, 7, 666-685.
- Listenberger, L.L., Han, X., Lewis, S.E., Cases, S., Farese, R.V., Jr., Ory, D.S. et Schaffer, J.E. (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(6), 3077-3082.
- Liu, J. (2014). Ethanol and liver: recent insights into the mechanisms of ethanol-induced fatty liver. *World J Gastroenterol*, 20(40), 14672-14685.
- Liu, L., Jiang, Q., Wang, X., Zhang, Y., Lin, R.C., Lam, S.M., Shui, G., Zhou, L., Li, P., Wang, Y., Cui, X., Gao, M., Zhang, L., Lv, Y., Xu, G., Liu, G., Zhao, D. et Yang, H. (2014). Adipose-specific knockout of SEIPIN/BSCL2 results in progressive lipodystrophy. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diabetes*, 63(7), 2320-2331.
- Liu, X., Burhans, M.S., Flowers, M.T. et Ntambi, J.M. (2016). Hepatic oleate regulates liver stress response partially through PGC-1 $\alpha$  during high-carbohydrate feeding. *J Hepatol*
- Liu, X., Miyazaki, M., Flowers, M.T., Sampath, H., Zhao, M., Chu, K., Paton, C.M., Joo, D.S. et Ntambi, J.M. (2010). Loss of Stearoyl-CoA desaturase-1 attenuates adipocyte inflammation: effects of adipocyte-derived oleate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(1), 31-38.
- Liu, X., Strable, M.S. et Ntambi, J.M. (2011). Stearoyl CoA desaturase 1: role in cellular inflammation and stress. *Adv Nutr*, 2(1), 15-22.



- Liu, Y., Michael, M.D., Kash, S., Bensch, W.R., Monia, B.P., Murray, S.F., Otto, K.A., Syed, S.K., Bhanot, S., Sloop, K.W., Sullivan, J.M. et Reifel-Miller, A. (2007). Deficiency of adiponectin receptor 2 reduces diet-induced insulin resistance but promotes type 2 diabetes. *Endocrinology*, 148(2), 683-692.
- Lodhi, I.J., Wei, X. et Semenkovich, C.F. (2011). Lipoexpediency: de novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends Endocrinol Metab*, 22(1), 1-8.
- Lonardo, A., Bellentani, S., Ratzliff, V. et Loria, P. (2011). Insulin resistance in nonalcoholic steatohepatitis: necessary but not sufficient - death of a dogma from analysis of therapeutic studies? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 5(2), 279-289.
- Lonardo, A., Lombardini, S., Ricchi, M., Scaglioni, F. et Loria, P. (2005). Review article: hepatic steatosis and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther*, 22 Suppl 2, 64-70.
- London, R.M. et George, J. (2007). Pathogenesis of NASH: animal models. *Clin Liver Dis*, 11(1), 55-74, viii.
- Long, A.P., Mannes Schmidt, A.K., VerBrugge, B., Dortch, M.R., Minkin, S.C., Prater, K.E., Biggerstaff, J.P., Dunlap, J.R. et Dalhaimer, P. (2012). Lipid droplet de novo formation and fission are linked to the cell cycle in fission yeast. *Traffic*, 13(5), 705-714.
- Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D., Jaswal, J.S. et Stanley, W.C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*, 90(1), 207-258.
- Lopez-Dominguez, J.A., Canovas, A., Medrano, J.F., Islas-Trejo, A., Kim, K., Taylor, S.L., Villalba, J.M., Lopez-Lluch, G., Navas, P. et Ramsey, J.J. (2016). Omega-3 fatty acids partially revert the metabolic gene expression profile induced by long-term calorie restriction. *Exp Gerontol*, 77, 29-37.
- Lopez-Vicario, C., Gonzalez-Periz, A., Rius, B., Moran-Salvador, E., Garcia-Alonso, V., Lozano, J.J., Bataller, R., Cofan, M., Kang, J.X., Arroyo, V., Claria, J. et Titos, E. (2014). Molecular interplay between Delta5/Delta6 desaturases and long-chain fatty acids in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*, 63(2), 344-355.
- Louet, J.F., Chatelain, F., Decaux, J.F., Park, E.A., Kohl, C., Pineau, T., Girard, J. et Pegorier, J.P. (2001). Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-independent pathway. *Biochem J*, 354(Pt 1), 189-197.

- Luca, A., Garcia-Pagan, J.C., Bosch, J., Feu, F., Caballeria, J., Groszmann, R.J. et Rodes, J. (1997). Effects of ethanol consumption on hepatic hemodynamics in patients with alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology*, 112(4), 1284-1289.
- Lucey, M.R., Mathurin, P. et Morgan, T.R. (2009). Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med*, 360(26), 2758-2769.
- Lundin, C., Nordstrom, R., Wagner, K., Windpassinger, C., Andersson, H., von Heijne, G. et Nilsson, I. (2006). Membrane topology of the human seipin protein. *FEBS Lett*, 580(9), 2281-2284.
- Lutchman, G., Modi, A., Kleiner, D.E., Promrat, K., Heller, T., Ghany, M., Borg, B., Loomba, R., Liang, T.J., Premkumar, A. et Hoofnagle, J.H. (2007). The effects of discontinuing pioglitazone in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 46(2), 424-429.
- Ma, L., Tsatsos, N.G. et Towle, H.C. (2005). Direct role of ChREBP.Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes. *J Biol Chem*, 280(12), 12019-12027.
- MacDonald, M.L., Singaraja, R.R., Bissada, N., Ruddle, P., Watts, R., Karasinska, J.M., Gibson, W.T., Fievet, C., Vance, J.E., Staels, B. et Hayden, M.R. (2008). Absence of stearoyl-CoA desaturase-1 ameliorates features of the metabolic syndrome in LDLR-deficient mice. *J Lipid Res*, 49(1), 217-229.
- MacDonald, M.L., van Eck, M., Hildebrand, R.B., Wong, B.W., Bissada, N., Ruddle, P., Kontush, A., Hussein, H., Pouladi, M.A., Chapman, M.J., Fievet, C., van Berkel, T.J., Staels, B., McManus, B.M. et Hayden, M.R. (2009). Despite antiatherogenic metabolic characteristics, SCD1-deficient mice have increased inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(3), 341-347.
- Magre, J., Delepine, M., Khallouf, E., Gedde-Dahl, T., Jr., Van Maldergem, L., Sobel, E., Papp, J., Meier, M., Megarbane, A., Bachy, A., Verloes, A., d'Abronzio, F.H., Seemanova, E., Assan, R., Baudic, N., Bourut, C., Czernichow, P., Huet, F., Grigorescu, F., de Kerdanet, M., Lacombe, D., Labrune, P., Lanza, M., Loret, H., Matsuda, F., Navarro, J., Nivelon-Chevalier, A., Polak, M., Robert, J.J., Tric, P., Tubiana-Rufi, N., Vigouroux, C., Weissenbach, J., Savasta, S., Maassen, J.A., Trygstad, O., Bogalho, P., Freitas, P., Medina, J.L., Bonnicci, F., Joffe, B.I., Loyson, G., Panz, V.R., Raal, F.J., O'Rahilly, S., Stephenson, T., Kahn, C.R., Lathrop, M., Capeau, J. et Group, B.W. (2001). Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet*, 28(4), 365-370.
- Man, W.C., Miyazaki, M., Chu, K. et Ntambi, J. (2006). Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis. *J Lipid Res*, 47(9), 1928-1939.

- Mao, J., DeMayo, F.J., Li, H., Abu-Elheiga, L., Gu, Z., Shaikenov, T.E., Kordari, P., Chirala, S.S., Heird, W.C. et Wakil, S.J. (2006). Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(22), 8552-8557.
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G.G. et Hill, R.A. (2002). Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26(11), 1407-1433.
- Marquardt, A., Stohr, H., White, K. et Weber, B.H. (2000). cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics*, 66(2), 175-183.
- Martin, S. et Parton, R.G. (2006). Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(5), 373-378.
- Martin-Dominguez, V., Gonzalez-Casas, R., Mendoza-Jimenez-Ridruejo, J., Garcia-Buey, L. et Moreno-Otero, R. (2013). Pathogenesis, diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Rev Esp Enferm Dig*, 105(7), 409-420.
- Martinez-Chantar, M.L., Corrales, F.J., Martinez-Cruz, L.A., Garcia-Trevijano, E.R., Huang, Z.Z., Chen, L., Kanel, G., Avila, M.A., Mato, J.M. et Lu, S.C. (2002). Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *FASEB J*, 16(10), 1292-1294.
- Masumoto, N., Lanyon-Hogg, T., Rodgers, U.R., Konitsiotis, A.D., Magee, A.I. et Tate, E.W. (2015). Membrane bound O-acyltransferases and their inhibitors. *Biochem Soc Trans*, 43(2), 246-252.
- Matsusue, K., Kusakabe, T., Noguchi, T., Takiguchi, S., Suzuki, T., Yamano, S. et Gonzalez, F.J. (2008). Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27. *Cell Metab*, 7(4), 302-311.
- Matsuzaka, T., Atsumi, A., Matsumori, R., Nie, T., Shinozaki, H., Suzuki-Kemuriyama, N., Kuba, M., Nakagawa, Y., Ishii, K., Shimada, M., Kobayashi, K., Yatoh, S., Takahashi, A., Takekoshi, K., Sone, H., Yahagi, N., Suzuki, H., Murata, S., Nakamuta, M., Yamada, N. et Shimano, H. (2012). Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 56(6), 2199-2208.
- Matsuzaka, T. et Shimano, H. (2011). Molecular mechanisms involved in hepatic steatosis and insulin resistance. *J Diabetes Investig*, 2(3), 170-175.
- Matthews, V.B., Allen, T.L., Risis, S., Chan, M.H., Henstridge, D.C., Watson, N., Zaffino, L.A., Babb, J.R., Boon, J., Meikle, P.J., Jowett, J.B., Watt, M.J., Jansson, J.O., Bruce, C.R. et Febbraio, M.A. (2010). Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia*, 53(11), 2431-2441.

- Mauvoisin, D. et Mounier, C. (2011). Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie*, 93(1), 78-86.
- Mazza, A., Fruci, B., Garinis, G.A., Giuliano, S., Malaguarnera, R. et Belfiore, A. (2012). The role of metformin in the management of NAFLD. *Exp Diabetes Res*, 2012, 716404.
- McClain, C.J., Mokshagundam, S.P., Barve, S.S., Song, Z., Hill, D.B., Chen, T. et Deaciuc, I. (2004). Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Alcohol*, 34(1), 67-79.
- McClain, C.J., Song, Z., Barve, S.S., Hill, D.B. et Deaciuc, I. (2004). Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287(3), G497-502.
- McCormack, L., Dutkowski, P., El-Badry, A.M. et Clavien, P.A. (2011). Liver transplantation using fatty livers: always feasible? *J Hepatol*, 54(5), 1055-1062.
- Mello, T., Ceni, E., Surrenti, C. et Galli, A. (2008). Alcohol induced hepatic fibrosis: role of acetaldehyde. *Mol Aspects Med*, 29(1-2), 17-21.
- Mendenhall, C.L. (1968). Anabolic steroid therapy as an adjunct to diet in alcoholic hepatic steatosis. *Am J Dig Dis*, 13(9), 783-791.
- Milic, S. et Stimac, D. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment. *Dig Dis*, 30(2), 158-162.
- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Elias, P.M. et Ntambi, J.M. (2005). Stearoyl-CoA desaturase-2 gene expression is required for lipid synthesis during early skin and liver development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(35), 12501-12506.
- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Man, W.C., Chu, K., Sampath, H., Kim, H.J. et Ntambi, J.M. (2004). Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 279(24), 25164-25171.
- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Sampath, H., Lee, S.H., Man, W.C., Chu, K., Peters, J.M., Gonzalez, F.J. et Ntambi, J.M. (2004). Reduced adiposity and liver steatosis by stearyl-CoA desaturase deficiency are independent of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *J Biol Chem*, 279(33), 35017-35024.
- Miyazaki, M., Flowers, M.T., Sampath, H., Chu, K., Oztelberger, C., Liu, X. et Ntambi, J.M. (2007). Hepatic stearyl-CoA desaturase-1 deficiency protects



- mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metab*, 6(6), 484-496.
- Miyazaki, M., Gomez, F.E. et Ntambi, J.M. (2002). Lack of stearoyl-CoA desaturase-1 function induces a palmitoyl-CoA Delta6 desaturase and represses the stearoyl-CoA desaturase-3 gene in the preputial glands of the mouse. *J Lipid Res*, 43(12), 2146-2154.
- Miyazaki, M., Jacobson, M.J., Man, W.C., Cohen, P., Asilmaz, E., Friedman, J.M. et Ntambi, J.M. (2003). Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearoyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors. *J Biol Chem*, 278(36), 33904-33911.
- Miyazaki, M., Kim, H.J., Man, W.C. et Ntambi, J.M. (2001). Oleoyl-CoA is the major de novo product of stearoyl-CoA desaturase 1 gene isoform and substrate for the biosynthesis of the Harderian gland 1-alkyl-2,3-diacylglycerol. *J Biol Chem*, 276(42), 39455-39461.
- Miyazaki, M., Kim, Y.C., Gray-Keller, M.P., Attie, A.D. et Ntambi, J.M. (2000). The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem*, 275(39), 30132-30138.
- Miyazaki, M., Kim, Y.C. et Ntambi, J.M. (2001). A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *J Lipid Res*, 42(7), 1018-1024.
- Miyazaki, M., Man, W.C. et Ntambi, J.M. (2001). Targeted disruption of stearoyl-CoA desaturase 1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid. *J Nutr*, 131(9), 2260-2268.
- Miyazaki, M. et Ntambi, J.M. (2003). Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 68(2), 113-121.
- Mohamed Amine Lounis, S.R., James M. Ntambi, Catherine Mounier. ( 2015). Role of Lipogenesis and Lipid Desaturases in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. Dans Ntambi, J. M. (dir.), *Hepatic De Novo Lipogenesis and Regulation of Metabolism* (p. 143-164) : Springer International Publishing.
- Moon, Y.A., Ochoa, C.R., Mitsche, M.A., Hammer, R.E. et Horton, J.D. (2014). Deletion of ELOVL6 blocks the synthesis of oleic acid but does not prevent the development of fatty liver or insulin resistance. *J Lipid Res*, 55(12), 2597-2605.
- Moon, Y.A., Shah, N.A., Mohapatra, S., Warrington, J.A. et Horton, J.D. (2001). Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by



- sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*, 276(48), 45358-45366.
- Moore, J.B., Gunn, P.J. et Fielding, B.A. (2014). The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*, 6(12), 5679-5703.
- Motomura, W., Inoue, M., Ohtake, T., Takahashi, N., Nagamine, M., Tanno, S., Kohgo, Y. et Okumura, T. (2006). Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. *Biochem Biophys Res Commun*, 340(4), 1111-1118.
- Mudaliar, S., Henry, R.R., Sanyal, A.J., Morrow, L., Marschall, H.U., Kipnes, M., Adorini, L., Sciacca, C.I., Clopton, P., Castelloe, E., Dillon, P., Pruzanski, M. et Shapiro, D. (2013). Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 145(3), 574-582 e571.
- Munteanu, M.A., Nagy, G.A. et Mircea, P.A. (2016). Current Management of NAFLD. *Clujul Med*, 89(1), 19-23.
- Musso, G., Gambino, R., Cassader, M. et Pagano, G. (2011). Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med*, 43(8), 617-649.
- Nachiappan, V., Curtiss, D., Corkey, B.E. et Kilpatrick, L. (1994). Cytokines inhibit fatty acid oxidation in isolated rat hepatocytes: synergy among TNF, IL-6, and IL-1. *Shock*, 1(2), 123-129.
- Nagaya, T., Tanaka, N., Suzuki, T., Sano, K., Horiuchi, A., Komatsu, M., Nakajima, T., Nishizawa, T., Joshita, S., Umemura, T., Ichijo, T., Matsumoto, A., Yoshizawa, K., Nakayama, J., Tanaka, E. et Aoyama, T. (2010). Down-regulation of SREBP-1c is associated with the development of burned-out NASH. *J Hepatol*, 53(4), 724-731.
- Nakamura, M.T. et Nara, T.Y. (2004). Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr*, 24, 345-376.
- Nanji, A.A. (2004). Role of different dietary fatty acids in the pathogenesis of experimental alcoholic liver disease. *Alcohol*, 34(1), 21-25.
- Nanji, A.A., Dannenberg, A.J., Jokelainen, K. et Bass, N.M. (2004). Alcoholic liver injury in the rat is associated with reduced expression of peroxisome proliferator-alpha (PPARalpha)-regulated genes and is ameliorated by PPARalpha activation. *J Pharmacol Exp Ther*, 310(1), 417-424.
- Nardi, F., Lipina, C., Magill, D., Hage Hassan, R., Hajdich, E., Gray, A. et Hundal, H.S. (2014). Enhanced insulin sensitivity associated with provision of mono

- and polyunsaturated fatty acids in skeletal muscle cells involves counter modulation of PP2A. *PLoS One*, 9(3), e92255.
- Neuschwander-Tetri, B.A. et Caldwell, S.H. (2003). Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*, 37(5), 1202-1219.
- Nile, A.H. et Hannoush, R.N. (2016). Fatty acylation of Wnt proteins. *Nat Chem Biol*, 12(2), 60-69.
- Nishiyama, Y., Goda, N., Kanai, M., Niwa, D., Osanai, K., Yamamoto, Y., Senoo-Matsuda, N., Johnson, R.S., Miura, S., Kabe, Y. et Suematsu, M. (2012). HIF-1 $\alpha$  induction suppresses excessive lipid accumulation in alcoholic fatty liver in mice. *J Hepatol*, 56(2), 441-447.
- Nobili, V., Alisi, A., Della Corte, C., Rise, P., Galli, C., Agostoni, C. et Bedogni, G. (2013). Docosahexaenoic acid for the treatment of fatty liver: randomised controlled trial in children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 23(11), 1066-1070.
- Novikoff, A.B., Novikoff, P.M., Rosen, O.M. et Rubin, C.S. (1980). Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Biol*, 87(1), 180-196.
- Ntambi, J.M., Miyazaki, M., Stoeck, J.P., Lan, H., Kendzierski, C.M., Yandell, B.S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J.M. et Attie, A.D. (2002). Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(17), 11482-11486.
- Nussbaum, J.M., Liu, L.J., Hasan, S.A., Schaub, M., McClendon, A., Stainier, D.Y. et Sakaguchi, T.F. (2013). Homeostatic generation of reactive oxygen species protects the zebrafish liver from steatosis. *Hepatology*, 58(4), 1326-1338.
- Nye, C.K., Hanson, R.W. et Kalhan, S.C. (2008). Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. *J Biol Chem*, 283(41), 27565-27574.
- O'Callaghan, B.L., Koo, S.H., Wu, Y., Freake, H.C. et Towle, H.C. (2001). Glucose regulation of the acetyl-CoA carboxylase promoter PI in rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 276(19), 16033-16039.
- O'Shea, R.S., Dasarathy, S., McCullough, A.J., Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver, D. et Practice Parameters Committee of the American College of, G. (2010). Alcoholic liver disease. *Hepatology*, 51(1), 307-328.
- Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Red Eagle, A., Vats, D., Morel, C.R., Goforth, M.H., Subramanian, V., Mukundan, L., Ferrante, A.W. et Chawla, A. (2008). Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPAR $\delta$  ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab*, 7(6), 496-507.

- Ortinou, L.C., Pickering, R.T., Nickelson, K.J., Stromsdorfer, K.L., Naik, C.Y., Haynes, R.A., Bauman, D.E., Rector, R.S., Fritsche, K.L. et Perfield, J.W., 2nd. (2012). Sterculic Oil, a Natural SCD1 Inhibitor, Improves Glucose Tolerance in Obese ob/ob Mice. *ISRN Endocrinol*, 2012, 947323.
- Pai, W.Y., Hsu, C.C., Lai, C.Y., Chang, T.Z., Tsai, Y.L. et Her, G.M. (2013). Cannabinoid receptor 1 promotes hepatic lipid accumulation and lipotoxicity through the induction of SREBP-1c expression in zebrafish. *Transgenic Res*, 22(4), 823-838.
- Paschos, P. et Paletas, K. (2009). Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia*, 13(1), 9-19.
- Pastor, A., Collado, P.S., Almar, M. et Gonzalez-Gallego, J. (1997). Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol*, 27(2), 363-370.
- Paton, C.M. et Ntambi, J.M. (2009). Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(1), E28-37.
- Payne, V.A., Grimsey, N., Tuthill, A., Virtue, S., Gray, S.L., Dalla Nora, E., Semple, R.K., O'Rahilly, S. et Rochford, J.J. (2008). The human lipodystrophy gene BSCL2/seipin may be essential for normal adipocyte differentiation. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diabetes*, 57(8), 2055-2060.
- Perktold, A., Zechmann, B., Daum, G. et Zellnig, G. (2007). Organelle association visualized by three-dimensional ultrastructural imaging of the yeast cell. *FEMS Yeast Res*, 7(4), 629-638.
- Pessayre, D., Berson, A., Fromenty, B. et Mansouri, A. (2001). Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis*, 21(1), 57-69.
- Pessayre, D., Mansouri, A. et Fromenty, B. (2002). Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282(2), G193-199.
- Pessione, F., Ramond, M.J., Peters, L., Pham, B.N., Batel, P., Rueff, B. et Valla, D.C. (2003). Five-year survival predictive factors in patients with excessive alcohol intake and cirrhosis. Effect of alcoholic hepatitis, smoking and abstinence. *Liver Int*, 23(1), 45-53.
- Peter, A., Cegan, A., Wagner, S., Elcnerova, M., Konigsrainer, A., Konigsrainer, I., Haring, H.U., Schleicher, E.D. et Stefan, N. (2011). Relationships between hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 activity and mRNA expression with liver fat content in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 300(2), E321-326.
- Petersson, H., Arnlov, J., Zethelius, B. et Riserus, U. (2010). Serum fatty acid composition and insulin resistance are independently associated with liver fat markers in elderly men. *Diabetes Res Clin Pract*, 87(3), 379-384.

- Petersson, H., Basu, S., Cederholm, T. et Riserus, U. (2008). Serum fatty acid composition and indices of stearyl-CoA desaturase activity are associated with systemic inflammation: longitudinal analyses in middle-aged men. *Br J Nutr*, 99(6), 1186-1189.
- Petersson, H., Lind, L., Hulthe, J., Elmgren, A., Cederholm, T. et Riserus, U. (2009). Relationships between serum fatty acid composition and multiple markers of inflammation and endothelial function in an elderly population. *Atherosclerosis*, 203(1), 298-303.
- Pettinelli, P., Del Pozo, T., Araya, J., Rodrigo, R., Araya, A.V., Smok, G., Csendes, A., Gutierrez, L., Rojas, J., Korn, O., Maluenda, F., Diaz, J.C., Rencoret, G., Braghetto, I., Castillo, J., Poniachik, J. et Videla, L.A. (2009). Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR- $\alpha$  ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. *Biochim Biophys Acta*, 1792(11), 1080-1086.
- Picklo, M.J. et Murphy, E.J. (2015). A High-Fat, High-Oleic Diet, But Not a High-Fat, Saturated Diet, Reduces Hepatic  $\alpha$ -Linolenic Acid and Eicosapentaenoic Acid Content in Mice. *Lipids*
- Pohl, J., Ring, A. et Stremmel, W. (2002). Uptake of long-chain fatty acids in HepG2 cells involves caveolae: analysis of a novel pathway. *J Lipid Res*, 43(9), 1390-1399.
- Postic, C. et Girard, J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest*, 118(3), 829-838.
- Prieur, X., Dollet, L., Takahashi, M., Nemani, M., Pillot, B., Le May, C., Mounier, C., Takigawa-Imamura, H., Zelenika, D., Matsuda, F., Feve, B., Capeau, J., Lathrop, M., Costet, P., Cariou, B. et Magre, J. (2013). Thiazolidinediones partially reverse the metabolic disturbances observed in Bsc12/seipin-deficient mice. *Diabetologia*, 56(8), 1813-1825.
- Prip-Buus, C., Perdureau, D., Foufelle, F., Maury, J., Ferre, P. et Girard, J. (1995). Induction of fatty-acid-synthase gene expression by glucose in primary culture of rat hepatocytes. Dependency upon glucokinase activity. *Eur J Biochem*, 230(1), 309-315.
- Promrat, K., Kleiner, D.E., Niemeier, H.M., Jackvony, E., Kearns, M., Wands, J.R., Fava, J.L. et Wing, R.R. (2010). Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 51(1), 121-129.
- Puri, P., Mirshahi, F., Cheung, O., Natarajan, R., Maher, J.W., Kellum, J.M. et Sanyal, A.J. (2008). Activation and dysregulation of the unfolded protein



- response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 134(2), 568-576.
- Puri, V., Konda, S., Ranjit, S., Aouadi, M., Chawla, A., Chouinard, M., Chakladar, A. et Czech, M.P. (2007). Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. *J Biol Chem*, 282(47), 34213-34218.
- Purushotham, A., Schug, T.T., Xu, Q., Surapureddi, S., Guo, X. et Li, X. (2009). Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab*, 9(4), 327-338.
- Ralston, J.C., Badoud, F., Cattrysse, B., McNicholas, P.D. et Mutch, D.M. (2014). Inhibition of stearoyl-CoA desaturase-1 in differentiating 3T3-L1 preadipocytes upregulates elongase 6 and downregulates genes affecting triacylglycerol synthesis. *Int J Obes (Lond)*, 38(11), 1449-1456.
- Ratzl, V., de Ledinghen, V., Oberti, F., Mathurin, P., Wartelle-Bladou, C., Renou, C., Sogni, P., Maynard, M., Larrey, D., Serfaty, L., Bonnefont-Rousselot, D., Bastard, J.P., Riviere, M., Spenard, J. et Fresgun. (2011). A randomized controlled trial of high-dose ursodesoxycholic acid for nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, 54(5), 1011-1019.
- Ratzl, V., Goodman, Z. et Sanyal, A. (2015). Current efforts and trends in the treatment of NASH. *J Hepatol*, 62(1 Suppl), S65-75.
- Rawson, R.B. (2003a). Control of lipid metabolism by regulated intramembrane proteolysis of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs). *Biochem Soc Symp*(70), 221-231.
- Rawson, R.B. (2003b). The SREBP pathway--insights from Insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(8), 631-640.
- Reddy, J.K. (2001). Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281(6), G1333-1339.
- Reddy, J.K. et Hashimoto, T. (2001). Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr*, 21, 193-230.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L. et Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev*, 14(22), 2819-2830.
- Ress, C. et Kaser, S. (2016). Mechanisms of intrahepatic triglyceride accumulation. *World J Gastroenterol*, 22(4), 1664-1673.



- Rinella, M.E., Siddiqui, M.S., Gardikiotes, K., Gottstein, J., Elias, M. et Green, R.M. (2011). Dysregulation of the unfolded protein response in db/db mice with diet-induced steatohepatitis. *Hepatology*, 54(5), 1600-1609.
- Robert, K., Nehme, J., Bourdon, E., Pivert, G., Friguet, B., Delcayre, C., Delabar, J.M. et Janel, N. (2005). Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. *Gastroenterology*, 128(5), 1405-1415.
- Robertson, G., Leclercq, I. et Farrell, G.C. (2001). Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281(5), G1135-1139.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M. et Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*, 434(7029), 113-118.
- Rolo, A.P., Teodoro, J.S. et Palmeira, C.M. (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*, 52(1), 59-69.
- Romero, A., Kirchner, H., Heppner, K., Pfluger, P.T., Tschop, M.H. et Nogueiras, R. (2010). GOAT: the master switch for the ghrelin system? *Eur J Endocrinol*, 163(1), 1-8.
- Ronis, M.J., Korourian, S., Zipperman, M., Hakkak, R. et Badger, T.M. (2004). Dietary saturated fat reduces alcoholic hepatotoxicity in rats by altering fatty acid metabolism and membrane composition. *J Nutr*, 134(4), 904-912.
- Ronis, M.J., Mercer, K.E., Gannon, B., Engi, B., Zimniak, P., Shearn, C.T., Orlicky, D.J., Albano, E., Badger, T.M. et Petersen, D.R. (2015). Increased 4-hydroxynonenal protein adducts in male GSTA4-4/PPAR-alpha double knockout mice enhance injury during early stages of alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 308(5), G403-415.
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*, 4(1), 177-197.
- Rutkowski, D.T. et Kaufman, R.J. (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol*, 14(1), 20-28.
- Ryan, M.C., Itsiopoulos, C., Thodis, T., Ward, G., Trost, N., Hofferberth, S., O'Dea, K., Desmond, P.V., Johnson, N.A. et Wilson, A.M. (2013). The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 59(1), 138-143.
- Salvado, L., Coll, T., Gomez-Foix, A.M., Salmeron, E., Barroso, E., Palomer, X. et Vazquez-Carrera, M. (2013). Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia*, 56(6), 1372-1382.

- Sampath, H. et Ntambi, J.M. (2006). Stearoyl-coenzyme A desaturase 1, sterol regulatory element binding protein-1c and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ : independent and interactive roles in the regulation of lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 9(2), 84-88.
- Sampath, H. et Ntambi, J.M. (2011). The role of stearyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 1243, 47-53.
- Samuel, V.T., Liu, Z.X., Qu, X., Elder, B.D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A.J. et Shulman, G.I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*, 279(31), 32345-32353.
- Samuel, V.T., Liu, Z.X., Wang, A., Beddow, S.A., Geisler, J.G., Kahn, M., Zhang, X.M., Monia, B.P., Bhanot, S. et Shulman, G.I. (2007). Inhibition of protein kinase C $\epsilon$  prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 117(3), 739-745.
- Samuel, V.T., Petersen, K.F. et Shulman, G.I. (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*, 375(9733), 2267-2277.
- Sato, R. (2009). SREBPs: protein interaction and SREBPs. *FEBS J*, 276(3), 622-627.
- Scaglia, N., Chisholm, J.W. et Igal, R.A. (2009). Inhibition of stearylCoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: role of AMPK. *PLoS One*, 4(8), e6812.
- Scarpulla, R.C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*, 1813(7), 1269-1278.
- Schreurs, M., Kuipers, F. et van der Leij, F.R. (2010). Regulatory enzymes of mitochondrial  $\beta$ -oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obes Rev*, 11(5), 380-388.
- Schroder, M. et Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, 74, 739-789.
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., Lustig, K.D. et Shan, B. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*, 14(22), 2831-2838.
- Schwarz, J.M., Linfoot, P., Dare, D. et Aghajanian, K. (2003). Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr*, 77(1), 43-50.
- Scriven, P., Brown, N.J., Pockley, A.G. et Wyld, L. (2007). The unfolded protein response and cancer: a brighter future unfolding? *J Mol Med (Berl)*, 85(4), 331-341.

- Seip, M. (1959). Lipodystrophy and gigantism with associated endocrine manifestations. A new diencephalic syndrome? *Acta Paediatr*, 48, 555-574.
- Sengupta, S., Peterson, T.R., Laplante, M., Oh, S. et Sabatini, D.M. (2010). mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature*, 468(7327), 1100-1104.
- Shen, L., Cui, A., Xue, Y., Cui, Y., Dong, X., Gao, Y., Yang, H., Fang, F. et Chang, Y. (2014). Hepatic differentiated embryo-chondrocyte-expressed gene 1 (Dec1) inhibits sterol regulatory element-binding protein-1c (Srebp-1c) expression and alleviates fatty liver phenotype. *J Biol Chem*, 289(34), 23332-23342.
- Shi, X., Li, J., Zou, X., Greggain, J., Rodkaer, S.V., Faergeman, N.J., Liang, B. et Watts, J.L. (2013). Regulation of lipid droplet size and phospholipid composition by stearoyl-CoA desaturase. *J Lipid Res*, 54(9), 2504-2514.
- Shimano, H., Horton, J.D., Hammer, R.E., Shimomura, I., Brown, M.S. et Goldstein, J.L. (1996). Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest*, 98(7), 1575-1584.
- Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Hasty, A.H., Osuga, J., Tamura, Y., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Ohashi, K., Harada, K., Gotoda, T., Ishibashi, S. et Yamada, N. (1999). Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem*, 274(50), 35832-35839.
- Shimomura, I., Hammer, R.E., Ikemoto, S., Brown, M.S. et Goldstein, J.L. (1999). Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature*, 401(6748), 73-76.
- Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L. et Brown, M.S. (1997). Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest*, 99(5), 838-845.
- Shimomura, I., Shimano, H., Korn, B.S., Bashmakov, Y. et Horton, J.D. (1998). Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem*, 273(52), 35299-35306.
- Silbernagel, G., Kovarova, M., Cegan, A., Machann, J., Schick, F., Lehmann, R., Haring, H.U., Stefan, N., Schleicher, E., Fritsche, A. et Peter, A. (2012). High hepatic SCD1 activity is associated with low liver fat content in healthy subjects under a lipogenic diet. *J Clin Endocrinol Metab*, 97(12), E2288-2292.

- Sim, W.C., Park, S., Lee, K.Y., Je, Y.T., Yin, H.Q., Choi, Y.J., Sung, S.H., Park, S.J., Park, H.J., Shin, K.J. et Lee, B.H. (2014). LXR-alpha antagonist meso-dihydroguaiaretic acid attenuates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver. *Biochem Pharmacol*, 90(4), 414-424.
- Simon, Y., Kessler, S.M., Gemperlein, K., Bohle, R.M., Muller, R., Haybaeck, J. et Kiemer, A.K. (2014). Elevated free cholesterol in a p62 overexpression model of non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*, 20(47), 17839-17850.
- Smagris, E., BasuRay, S., Li, J., Huang, Y., Lai, K.M., Gromada, J., Cohen, J.C. et Hobbs, H.H. (2015). Pnpla3<sup>I148M</sup> knockin mice accumulate PNPLA3 on lipid droplets and develop hepatic steatosis. *Hepatology*, 61(1), 108-118.
- Smith, S.J., Cases, S., Jensen, D.R., Chen, H.C., Sande, E., Tow, B., Sanan, D.A., Raber, J., Eckel, R.H. et Farese, R.V., Jr. (2000). Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat Genet*, 25(1), 87-90.
- Solinas, G., Boren, J. et Dulloo, A.G. (2015). De novo lipogenesis in metabolic homeostasis: More friend than foe? *Mol Metab*, 4(5), 367-377.
- Soni, K.G., Mardones, G.A., Sougrat, R., Smirnova, E., Jackson, C.L. et Bonifacino, J.S. (2009). Coatamer-dependent protein delivery to lipid droplets. *J Cell Sci*, 122(Pt 11), 1834-1841.
- Sorensen, T.I., Orholm, M., Bentsen, K.D., Hoybye, G., Eghoje, K. et Christoffersen, P. (1984). Prospective evaluation of alcohol abuse and alcoholic liver injury in men as predictors of development of cirrhosis. *Lancet*, 2(8397), 241-244.
- Spadaro, L., Magliocco, O., Spampinato, D., Piro, S., Oliveri, C., Alagona, C., Papa, G., Rabuazzo, A.M. et Purrello, F. (2008). Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis*, 40(3), 194-199.
- Speliotes, E.K., Yerges-Armstrong, L.M., Wu, J., Hernaez, R., Kim, L.J., Palmer, C.D., Gudnason, V., Eiriksdottir, G., Garcia, M.E., Launer, L.J., Nalls, M.A., Clark, J.M., Mitchell, B.D., Shuldiner, A.R., Butler, J.L., Tomas, M., Hoffmann, U., Hwang, S.J., Massaro, J.M., O'Donnell, C.J., Sahani, D.V., Salomaa, V., Schadt, E.E., Schwartz, S.M., Siscovick, D.S., Nash, C.R.N., Consortium, G., Investigators, M., Voight, B.F., Carr, J.J., Feitosa, M.F., Harris, T.B., Fox, C.S., Smith, A.V., Kao, W.H., Hirschhorn, J.N., Borecki, I.B. et Consortium, G. (2011). Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet*, 7(3), e1001324.
- Sprecher, H. (2002). The roles of anabolic and catabolic reactions in the synthesis and recycling of polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 67(2-3), 79-83.



- Spruss, A., Kanuri, G., Wagnerberger, S., Haub, S., Bischoff, S.C. et Bergheim, I. (2009). Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*, 50(4), 1094-1104.
- St-Jules, D.E., Watters, C.A., Brunt, E.M., Wilkens, L.R., Novotny, R., Belt, P., Lavine, J.E. et Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research, N. (2013). Estimation of fish and omega-3 fatty acid intake in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 57(5), 627-633.
- Stefan, N. et Haring, H.U. (2011). The metabolically benign and malignant fatty liver. *Diabetes*, 60(8), 2011-2017.
- Stefan, N., Peter, A., Cegan, A., Staiger, H., Machann, J., Schick, F., Claussen, C.D., Fritsche, A., Haring, H.U. et Schleicher, E. (2008). Low hepatic stearyl-CoA desaturase 1 activity is associated with fatty liver and insulin resistance in obese humans. *Diabetologia*, 51(4), 648-656.
- Stickel, F. et Hampe, J. (2012). Genetic determinants of alcoholic liver disease. *Gut*, 61(1), 150-159.
- Stickel, F., Hoehn, B., Schuppan, D. et Seitz, H.K. (2003). Review article: Nutritional therapy in alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 18(4), 357-373.
- Stone, S.J., Levin, M.C. et Farese, R.V., Jr. (2006). Membrane topology and identification of key functional amino acid residues of murine acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase-2. *J Biol Chem*, 281(52), 40273-40282.
- Strable, M.S. et Ntambi, J.M. (2010). Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 45(3), 199-214.
- Straub, B.K., Stoeffel, P., Heid, H., Zimbelmann, R. et Schirmacher, P. (2008). Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatology*, 47(6), 1936-1946.
- Stremmel, W. et Berk, P.D. (1986). Hepatocellular influx of [<sup>14</sup>C]oleate reflects membrane transport rather than intracellular metabolism or binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(10), 3086-3090.
- Su, X. et Abumrad, N.A. (2009). Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends Endocrinol Metab*, 20(2), 72-77.
- Suk, K.T., Kim, M.Y. et Baik, S.K. (2014). Alcoholic liver disease: treatment. *World J Gastroenterol*, 20(36), 12934-12944.
- Sullivan, B.D., Evans, J.E., Krenzer, K.L., Reza Dana, M. et Sullivan, D.A. (2000). Impact of antiandrogen treatment on the fatty acid profile of neutral lipids in human meibomian gland secretions. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(12), 4866-4873.



- Sun, F., Xie, M.L., Xue, J. et Wang, H.B. (2010). Osthonol regulates hepatic PPAR alpha-mediated lipogenic gene expression in alcoholic fatty liver murine. *Phytomedicine*, 17(8-9), 669-673.
- Szendroedi, J. et Roden, M. (2009). Ectopic lipids and organ function. *Curr Opin Lipidol*, 20(1), 50-56.
- Szymanski, K.M., Binns, D., Bartz, R., Grishin, N.V., Li, W.P., Agarwal, A.K., Garg, A., Anderson, R.G. et Goodman, J.M. (2007). The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(52), 20890-20895.
- Tai, E.S., bin Ali, A., Zhang, Q., Loh, L.M., Tan, C.E., Retnam, L., El Oakley, R.M. et Lim, S.K. (2003). Hepatic expression of PPARalpha, a molecular target of fibrates, is regulated during inflammation in a gender-specific manner. *FEBS Lett*, 546(2-3), 237-240.
- Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T. et Takada, S. (2006). Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell*, 11(6), 791-801.
- Takahashi, Y., Soejima, Y. et Fukusato, T. (2012). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*, 18(19), 2300-2308.
- Talukder, M.M., Sim, M.F., O'Rahilly, S., Edwardson, J.M. et Rochford, J.J. (2015). Seipin oligomers can interact directly with AGPAT2 and lipin 1, physically scaffolding critical regulators of adipogenesis. *Mol Metab*, 4(3), 199-209.
- Tan, T.C., Crawford, D.H., Jaskowski, L.A., Murphy, T.L., Santrampurwala, N., Crane, D., Clouston, A.D., Subramaniam, V.N., Anderson, G.J. et Fletcher, L.M. (2013). A corn oil-based diet protects against combined ethanol and iron-induced liver injury in a mouse model of hemochromatosis. *Alcohol Clin Exp Res*, 37(10), 1619-1631.
- Tan, T.C., Crawford, D.H., Jaskowski, L.A., Subramaniam, V.N., Clouston, A.D., Crane, D.I., Bridle, K.R., Anderson, G.J. et Fletcher, L.M. (2013). Excess iron modulates endoplasmic reticulum stress-associated pathways in a mouse model of alcohol and high-fat diet-induced liver injury. *Lab Invest*, 93(12), 1295-1312.
- Teli, M.R., Day, C.P., Burt, A.D., Bennett, M.K. et James, O.F. (1995). Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet*, 346(8981), 987-990.

- Teli, M.R., James, O.F., Burt, A.D., Bennett, M.K. et Day, C.P. (1995). The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology*, 22(6), 1714-1719.
- Thakur, P.C., Stuckenholz, C., Rivera, M.R., Davison, J.M., Yao, J.K., Amsterdam, A., Sadler, K.C. et Bahary, N. (2011). Lack of de novo phosphatidylinositol synthesis leads to endoplasmic reticulum stress and hepatic steatosis in *cdipt*-deficient zebrafish. *Hepatology*, 54(2), 452-462.
- Thomas, S.E., Dalton, L.E., Daly, M.L., Malzer, E. et Marciniak, S.J. (2010). Diabetes as a disease of endoplasmic reticulum stress. *Diabetes Metab Res Rev*, 26(8), 611-621.
- Thupari, J.N., Landree, L.E., Ronnett, G.V. et Kuhajda, F.P. (2002). C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(14), 9498-9502.
- Tian, Y., Bi, J., Shui, G., Liu, Z., Xiang, Y., Liu, Y., Wenk, M.R., Yang, H. et Huang, X. (2011). Tissue-autonomous function of *Drosophila* seipin in preventing ectopic lipid droplet formation. *PLoS Genet*, 7(4), e1001364.
- Tilg, H. et Diehl, A.M. (2000). Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*, 343(20), 1467-1476.
- Tovar, A.R., Torre-Villalvazo, I., Ochoa, M., Elias, A.L., Ortiz, V., Aguilar-Salinas, C.A. et Torres, N. (2005). Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker *fa/fa* rats. *J Lipid Res*, 46(9), 1823-1832.
- Ulven, S.M., Dalen, K.T., Gustafsson, J.A. et Nebb, H.I. (2005). LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 73(1), 59-63.
- Unger, R.H. (2002). Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*, 53, 319-336.
- Unger, R.H. (2003). Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology*, 144(12), 5159-5165.
- Unger, R.H., Clark, G.O., Scherer, P.E. et Orci, L. (2010). Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta*, 1801(3), 209-214.
- Valls, C., Iannaccone, R., Alba, E., Murakami, T., Hori, M., Passariello, R. et Vilgrain, V. (2006). Fat in the liver: diagnosis and characterization. *Eur Radiol*, 16(10), 2292-2308.
- van Herpen, N.A. et Schrauwen-Hinderling, V.B. (2008). Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav*, 94(2), 231-241.
- Vega, R.B., Huss, J.M. et Kelly, D.P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in transcriptional control of

- nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol*, 20(5), 1868-1876.
- Velasco, G., Gomez del Pulgar, T., Carling, D. et Guzman, M. (1998). Evidence that the AMP-activated protein kinase stimulates rat liver carnitine palmitoyltransferase I by phosphorylating cytoskeletal components. *FEBS Lett*, 439(3), 317-320.
- Veldt, B.J., Laine, F., Guillygomarc'h, A., Lauvin, L., Boudjema, K., Messner, M., Brissot, P., Deugnier, Y. et Moirand, R. (2002). Indication of liver transplantation in severe alcoholic liver cirrhosis: quantitative evaluation and optimal timing. *J Hepatol*, 36(1), 93-98.
- Vernon, R.G., Barber, M.C. et Travers, M.T. (1999). Present and future studies on lipogenesis in animals and human subjects. *Proc Nutr Soc*, 58(3), 541-549.
- Vessby, B., Gustafsson, I.B., Tengblad, S., Boberg, M. et Andersson, A. (2002). Desaturation and elongation of Fatty acids and insulin action. *Ann N Y Acad Sci*, 967, 183-195.
- Vessby, B., Uusitupa, M., Hermansen, K., Riccardi, G., Rivellese, A.A., Tapsell, L.C., Nalsen, C., Berglund, L., Louheranta, A., Rasmussen, B.M., Calvert, G.D., Maffetone, A., Pedersen, E., Gustafsson, I.B., Storlien, L.H. et Study, K. (2001). Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia*, 44(3), 312-319.
- Viollet, B., Guigas, B., Leclerc, J., Hebrard, S., Lantier, L., Mounier, R., Andreelli, F. et Foretz, M. (2009). AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol (Oxf)*, 196(1), 81-98.
- von Roemeling, C.A., Marlow, L.A., Wei, J.J., Cooper, S.J., Caulfield, T.R., Wu, K., Tan, W.W., Tun, H.W. et Copland, J.A. (2013). Stearoyl-CoA desaturase 1 is a novel molecular therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 19(9), 2368-2380.
- Walter, P. et Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059), 1081-1086.
- Walther, T.C. et Farese, R.V., Jr. (2009). The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*, 1791(6), 459-466.
- Walther, T.C. et Farese, R.V., Jr. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem*, 81, 687-714.
- Wang, C.W., Miao, Y.H. et Chang, Y.S. (2014). Control of lipid droplet size in budding yeast requires the collaboration between Fld1 and Ldb16. *J Cell Sci*, 127(Pt 6), 1214-1228.

- Wang, H., Sreenivasan, U., Hu, H., Saladino, A., Polster, B.M., Lund, L.M., Gong, D.W., Stanley, W.C. et Sztalryd, C. (2011). Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J Lipid Res*, 52(12), 2159-2168.
- Wang, J., Yu, L., Schmidt, R.E., Su, C., Huang, X., Gould, K. et Cao, G. (2005). Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun*, 332(3), 735-742.
- Waters, K.M. et Ntambi, J.M. (1994). Insulin and dietary fructose induce stearyl-CoA desaturase 1 gene expression of diabetic mice. *J Biol Chem*, 269(44), 27773-27777.
- Wei, Y., Wang, D., Topczewski, F. et Pagliassotti, M.J. (2006). Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291(2), E275-281.
- Whitehead, J.P., Richards, A.A., Hickman, I.J., Macdonald, G.A. et Prins, J.B. (2006). Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*, 8(3), 264-280.
- Wilfling, F., Haas, J.T., Walther, T.C. et Farese, R.V., Jr. (2014). Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 29, 39-45.
- Wilkin, R.J., Lalor, P.F., Parker, R. et Newsome, P.N. (2016). Murine Models of Acute Alcoholic Hepatitis and Their Relevance to Human Disease. *Am J Pathol*, 186(4), 748-760.
- Willebrords, J., Pereira, I.V., Maes, M., Crespo Yanguas, S., Colle, I., Van Den Bossche, B., Da Silva, T.C., de Oliveira, C.P., Andraus, W., Alves, V.A., Cogliati, B. et Vinken, M. (2015). Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. *Prog Lipid Res*, 59, 106-125.
- Wolinski, H., Hofbauer, H.F., Hellauer, K., Cristobal-Sarramian, A., Kolb, D., Radulovic, M., Knittelfelder, O.L., Rechberger, G.N. et Kohlwein, S.D. (2015). Seipin is involved in the regulation of phosphatidic acid metabolism at a subdomain of the nuclear envelope in yeast. *Biochim Biophys Acta*, 1851(11), 1450-1464.
- Wolinski, H., Kolb, D., Hermann, S., Koning, R.I. et Kohlwein, S.D. (2011). A role for seipin in lipid droplet dynamics and inheritance in yeast. *J Cell Sci*, 124(Pt 22), 3894-3904.
- Woo Baidal, J.A. et Lavine, J.E. (2016). The intersection of nonalcoholic fatty liver disease and obesity. *Sci Transl Med*, 8(323), 323rv321.



- Wortham, M., He, L., Gyamfi, M., Copple, B.L. et Wan, Y.J. (2008). The transition from fatty liver to NASH associates with SREBP-1c depletion in db/db mice fed a methionine choline-deficient diet. *Dig Dis Sci*, 53(10), 2761-2774.
- Wu, L., Zhou, L., Chen, C., Gong, J., Xu, L., Ye, J., Li, D. et Li, P. (2014). Cidea controls lipid droplet fusion and lipid storage in brown and white adipose tissue. *Sci China Life Sci*, 57(1), 107-116.
- Wu, T., Liu, Y.H., Fu, Y.C., Liu, X.M. et Zhou, X.H. (2014). Direct evidence of sirtuin downregulation in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Ann Clin Lab Sci*, 44(4), 410-418.
- Xiao, C., Giacca, A., Carpentier, A. et Lewis, G.F. (2006). Differential effects of monounsaturated, polyunsaturated and saturated fat ingestion on glucose-stimulated insulin secretion, sensitivity and clearance in overweight and obese, non-diabetic humans. *Diabetologia*, 49(6), 1371-1379.
- Yagi, T., Ito, D., Nihei, Y., Ishihara, T. et Suzuki, N. (2011). N88S seipin mutant transgenic mice develop features of seipinopathy/BSCL2-related motor neuron disease via endoplasmic reticulum stress. *Hum Mol Genet*, 20(19), 3831-3840.
- Yahagi, N., Shimano, H., Hasty, A.H., Matsuzaka, T., Ide, T., Yoshikawa, T., Amemiya-Kudo, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Nagai, R., Ishibashi, S. et Yamada, N. (2002). Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in *Lep(ob)/Lep(ob)* mice. *J Biol Chem*, 277(22), 19353-19357.
- Yamada, K., Mizukoshi, E., Sunagozaka, H., Arai, K., Yamashita, T., Takeshita, Y., Misu, H., Takamura, T., Kitamura, S., Zen, Y., Nakanuma, Y., Honda, M. et Kaneko, S. (2015). Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int*, 35(2), 582-590.
- Yamashita, H., Kaneyuki, T. et Tagawa, K. (2001). Production of acetate in the liver and its utilization in peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1532(1-2), 79-87.
- Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., Kubota, T., Ito, Y., Kamon, J., Tsuchida, A., Kumagai, K., Kozono, H., Hada, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., Ide, T., Murakami, K., Awazawa, M., Takamoto, I., Froguel, P., Hara, K., Tobe, K., Nagai, R., Ueki, K. et Kadowaki, T. (2007). Targeted disruption of *AdipoR1* and *AdipoR2* causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med*, 13(3), 332-339.
- Yamazaki, Y., Usui, I., Kanatani, Y., Matsuya, Y., Tsuneyama, K., Fujisaka, S., Bukhari, A., Suzuki, H., Senda, S., Imanishi, S., Hirata, K., Ishiki, M.,



- Hayashi, R., Urakaze, M., Nemoto, H., Kobayashi, M. et Tobe, K. (2009). Treatment with SRT1720, a SIRT1 activator, ameliorates fatty liver with reduced expression of lipogenic enzymes in MSG mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(5), E1179-1186.
- Yang, W., Thein, S., Guo, X., Xu, F., Venkatesh, B., Sugii, S., Radda, G.K. et Han, W. (2013). Seipin differentially regulates lipogenesis and adipogenesis through a conserved core sequence and an evolutionarily acquired C-terminus. *Biochem J*, 452(1), 37-44.
- Yang, W., Thein, S., Wang, X., Bi, X., Ericksen, R.E., Xu, F. et Han, W. (2014). BSCL2/seipin regulates adipogenesis through actin cytoskeleton remodelling. *Hum Mol Genet*, 23(2), 502-513.
- Yang, Z.X., Shen, W. et Sun, H. (2010). Effects of nuclear receptor FXR on the regulation of liver lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int*, 4(4), 741-748.
- Yin, M., Wheeler, M.D., Kono, H., Bradford, B.U., Gallucci, R.M., Luster, M.I. et Thurman, R.G. (1999). Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology*, 117(4), 942-952.
- Yki-Jarvinen, H. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2(11), 901-910.
- You, M., Cao, Q., Liang, X., Ajmo, J.M. et Ness, G.C. (2008). Mammalian sirtuin 1 is involved in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. *J Nutr*, 138(3), 497-501.
- You, M., Fischer, M., Deeg, M.A. et Crabb, D.W. (2002). Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). *J Biol Chem*, 277(32), 29342-29347.
- You, M., Matsumoto, M., Pacold, C.M., Cho, W.K. et Crabb, D.W. (2004). The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver. *Gastroenterology*, 127(6), 1798-1808.
- Zeeshan, H.M., Lee, G.H., Kim, H.R. et Chae, H.J. (2016). Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *Int J Mol Sci*, 17(3)
- Zein, C.O., Yerian, L.M., Gogate, P., Lopez, R., Kirwan, J.P., Feldstein, A.E. et McCullough, A.J. (2011). Pentoxifylline improves nonalcoholic steatohepatitis: a randomized placebo-controlled trial. *Hepatology*, 54(5), 1610-1619.
- Zelber-Sagi, S., Kessler, A., Brazowsky, E., Webb, M., Lurie, Y., Santo, M., Leshno, M., Blendis, L., Halpern, Z. et Oren, R. (2006). A double-blind randomized

placebo-controlled trial of orlistat for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 4(5), 639-644.

- Zhang, C., Wang, G., Zheng, Z., Maddipati, K.R., Zhang, X., Dyson, G., Williams, P., Duncan, S.A., Kaufman, R.J. et Zhang, K. (2012). Endoplasmic reticulum-tethered transcription factor cAMP responsive element-binding protein, hepatocyte specific, regulates hepatic lipogenesis, fatty acid oxidation, and lipolysis upon metabolic stress in mice. *Hepatology*, 55(4), 1070-1082.
- Zhang, F., Kong, D., Lu, Y. et Zheng, S. (2013). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma as a therapeutic target for hepatic fibrosis: from bench to bedside. *Cell Mol Life Sci*, 70(2), 259-276.
- Zhang, X.Q., Xu, C.F., Yu, C.H., Chen, W.X. et Li, Y.M. (2014). Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 20(7), 1768-1776.
- Zheng, Y., Eilertsen, K.J., Ge, L., Zhang, L., Sundberg, J.P., Prouty, S.M., Stenn, K.S. et Parimoo, S. (1999). *Scd1* is expressed in sebaceous glands and is disrupted in the asebia mouse. *Nat Genet*, 23(3), 268-270.
- Zheng, Y., Prouty, S.M., Harmon, A., Sundberg, J.P., Stenn, K.S. et Parimoo, S. (2001). *Scd3*--a novel gene of the stearoyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. *Genomics*, 71(2), 182-191.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J. et Moller, D.E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 108(8), 1167-1174.
- Zhu, L., Wang, L., Wang, X., Luo, X., Yang, L., Zhang, R., Yin, H., Xie, D., Pan, Y. et Chen, Y. (2011). Hepatic deletion of *Smad7* in mouse leads to spontaneous liver dysfunction and aggravates alcoholic liver injury. *PLoS One*, 6(2), e17415.